

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 4 月 3 日 (03.04.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
**WO 03/027290 A1**

(51) 国際特許分類: **C12N 15/29, C12Q 1/68**

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/09429

(22) 国際出願日: 2002 年 9 月 13 日 (13.09.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2001-285247 2001 年 9 月 19 日 (19.09.2001) JP  
特願2001-309135 2001 年 10 月 4 日 (04.10.2001) JP  
特願2002-185709 2002 年 6 月 26 日 (26.06.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP]; 〒105-8422 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号 Tokyo (JP). シンジェンタ リミテッド (SYNGENTA LIMITED) [GB/GB]; GU27 3JE サリーヘーゼルミアファーンハースト Surrey (GB).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小森 俊之 (KOMORI, Toshiyuki) [JP/JP]; 〒438-0802 静岡県磐田郡豊田町 東原 7 0 0 番地 日本たばこ産業株式会社 植物イノベーションセンター内 Shizuoka (JP). 太田 象三 (OTA, Shozo) [JP/JP]; 〒227-8512 神奈川県横浜市青葉区 梅が丘 6-2 日本たばこ産業株式会社 たばこ事業本部内 Kanagawa (JP). 村井 宣彦 (MURAI, Nobuhiko) [JP/JP]; 〒105-8422 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号 日本たばこ産業株式会社 関連事業室内 Tokyo (JP). 樋

江井 祐弘 (HIEI, Yuko) [JP/JP]; 〒438-0802 静岡県磐田郡豊田町 東原 7 0 0 番地 日本たばこ産業株式会社 植物イノベーションセンター内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル 2 0 6 区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF IMPARTING OR CONTROLLING FERTILITY WITH THE USE OF FERTILITY RESTORING GENE FOR RICE BT-MALE STERILITY CYTOPLASM AND METHOD OF JUDGING THE EXISTENCE OF FERTILITY RESTORING GENE

(54) 発明の名称: イネ BT 型雄性不稔細胞質に対する稔性回復遺伝子を利用した、稔性の付与若しくは抑制方法、及び稔性回復遺伝子の存在の識別方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of imparting or controlling fertility to rice BT-male sterility cytoplasm and a method of judging the existence of a fertility restoring gene. In these methods, use is made of a nucleic acid having the base sequence represented by SEQ ID NO:27 or a nucleic acid having a base sequence showing at least a 70% identity with the base sequence represented by SEQ ID NO:27 and having a function of restoring fertility. Alternatively, use is made of a nucleic acid having the base sequence consisting of the bases at the 38538- to 54123-positions in the base sequence represented by SEQ ID NO:27 or a nucleic acid having a base sequence showing at least a 70% identity with the base sequence consisting of the bases at the 38538- to 54123-positions in the base sequence represented by SEQ ID NO:27 and having a function of restoring fertility.

[続葉有]



WO 03/027290 A1



---

(57) 要約:

本発明は、イネＢＴ型雄性不稔細胞質に対する、稔性の付与若しくは抑制方法、及び稔性回復遺伝子の存在の識別方法を提供することを目的とする。本発明は、配列番号２７の塩基配列を有する核酸、又は配列番号２７の塩基配列と少なくとも７０％同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸を利用するものである。あるいは、配列番号２７の塩基３８５３８－５４１２３の塩基配列を有する核酸、又は配列番号２７の塩基３８５３８－５４１２３の塩基配列と少なくとも７０％同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸を利用する。

## 明細書

イネBT型雄性不稔細胞質に対する稔性回復遺伝子を利用した、稔性の付与若しくは抑制方法、及び稔性回復遺伝子の存在の識別方法

## 5 技術分野

本発明は、イネBT型雄性不稔細胞質に対する稔性回復遺伝子を利用した、稔性の付与若しくは抑制方法、及び稔性回復遺伝子の存在の識別方法に関する。

本出願は、2001年9月19日に提出された日本特許出願 特願2001-285247号、2001年10月4日に提出された日本特許出願 特願2001-309135号及び2002年6月26日に提出された日本特許出願 特願2002-185709号を基礎とする優先権主張出願である。当該3つの日本特許出願の内容は全て本明細書に援用される。

## 背景技術

15 イネは自殖性植物であるため、品種間で交雑を行う場合には、まず自家受精を避けるためにイネの穎花が開花する直前に穎花内の雄しべを全て取り除き、次いで交雑をする花粉親品種由来の花粉を用いて受精させる必要がある。しかしながら、このような手作業による交雑方法で商業的規模での大量の雑種種子を生産することは不可能である。

20 そこで、ハイブリッドライスの生産には、細胞質雄性不稔を利用する三系法が利用されている。三系法とは、雄性不稔細胞質を保有する系統である不稔系統、Rf-1遺伝子を保有する系統である回復系統、および核遺伝子是不稔系統と同一であって不稔細胞質を保有しない系統である維持系統とを使用する方法をいう。これらの3系統を用いて、(i) 不稔系統に回復系統の花粉を受精させることによりハイブリッド種子を獲得することができ、(ii) 一方、不稔系統に維持系統の花粉を受精させることにより不稔系統を維持することができる。

25 三系法でBT型雄性不稔細胞質を利用するにあたっては、回復系統のイネを育成するために、育種における各過程で育成中のイネがRf-1遺伝子を保有すること、また、最終段階ではRf-1遺伝子をホモで保有することを確認する必要

がある。また、三系法において、回復系統に使用する品種が確実にR f - 1 遺伝子を保有することを調べたり、得られたハイブリッド種子が稔性を回復しているか確認するために、R f - 1 遺伝子の存在を調べる必要が生じる場合もある。

5 従来、植物体中でのR f - 1 遺伝子座の遺伝子型を推定するためには、まず、検定系統と交配を行った交配種子から植物体 (F 1) を形成し、次いでF 1 植物を自殖させてその種子の形成率が一定以上 (例えば70~80%以上) である個体の出現頻度を調査する必要があった。なお、検定系統とは、維持系統、不稔系統あるいは両系統のセットを指し、目的とする被検定個体の細胞質がBT型か通常細胞質か、あるいは不明かにより適宜選択するものである。不稔系統を検定系  
10 統として用いる場合は母親として、維持系統を検定系統として用いる場合は父親として、それぞれ被検定個体に交配する。

しかしながら、これらの方法を行うには、莫大な労力と時間を要する。また、種子稔性は、環境要因の影響を受けやすいので、低温・日照不足などの不良環境で調査すれば、遺伝子型の構成によらず不稔になる場合があり、R f - 1 遺伝子  
15 座の遺伝子型推定が正確に行えないという問題を有していた。

このような問題を解消するために、最近では、分子生物学的方法によりR f - 1 遺伝子の存在を判別する方法も提案されている。それは、R f - 1 遺伝子と連鎖する塩基配列 (以下、DNA マーカーという) を検出することにより、R f - 1 遺伝子の存在または不存在を調べる方法である。因みに、R f - 1 遺伝子のDNA配列は未解読であるため、直接R f - 1 遺伝子を検出することは、現在の技術では不可能であった。  
20

例えば、イネのR f - 1 遺伝子座は第10染色体上に存在し、そして、制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析に使用することができるDNAマーカー (RFLPマーカー) 座G291とG127との間であることが報告されている (Fuk  
25 u t a e t a l . 1992, J p n J . B r e e d . 42 (s u p l . 1) 164-165)。このため、R f - 1 遺伝子と連鎖するDNAマーカー座G291およびG127の遺伝子型を調査することにより、R f - 1 遺伝子座の遺伝子型を推定することが可能である。



しかしながら、従来の分子生物学的方法にはいくつかの問題が存在する。第一の問題は、従来の方法では、使用するマーカーがRFLPマーカーであり、これを検出するためにはサザンブロット解析を行う必要があるという点である。サザンブロット解析を行うためには、被検定個体から数マイクログラム単位の精製されたDNAを必要とし、さらに制限酵素処理、電気泳動、ブロッティング、プローブとのハイブリダイゼーション、およびシグナルの検出からなる一連の作業手順を行う必要があるため、多大な労力が必要であるうえに、検定結果を得るまでに1週間程度かかっていた。

第二の問題は、RFLPマーカー座G291とG127の間の遺伝子地図距離は約30cM（イネDNAでは約9000kbpに相当する）と長いため、二重組換えが起こる可能性が数%程度はあると考えられ、Rf-1遺伝子座の遺伝子型が必ずしも正確に推定できないことである。

さらに第三の問題は、Rf-1遺伝子の存在をRFLPマーカー座G291およびG127の遺伝子型を調査することにより推定する場合、選抜の結果育成される稔性回復系統には、Rf-1遺伝子と共に、RFLPマーカー座G291とG127の間の遺伝子領域も導入されるという点である。その結果、導入DNA配列は30cM以上のRf-1遺伝子ドナー親由来の染色体領域を有することになり、導入DNA領域中に存在する可能性がある劣悪遺伝子をRf-1遺伝子と同時に導入してしまう危険性があつた。

このような問題を解決するため、Rf-1遺伝子座と連鎖する優性DNAマーカー（特開平7-222588）および共優性DNAマーカー（特開平9-313187）が開発されている。これらのマーカーは、Rf-1遺伝子座とそれぞれ、 $1.6 \pm 0.7$  cM（イネDNAでは約480kbpに相当）および $3.7 \pm 1.1$  cM（イネDNAでは約1110kbpに相当）の遺伝的距離で連鎖しており、両座はRf-1遺伝子座を挟む位置関係にある。そのため、優性PCRマーカー座および共優性PCRマーカー座は、これらが両方とも存在することによって、Rf-1遺伝子の存在を推定することができる。また、共優性PCRマーカーの使用は、Rf-1遺伝子座の遺伝子型がホモかヘテロかも推定することを可能にする。

しかしながら、これらのPCRマーカーを使用する場合にも、依然としていくつかの問題がある。この共優性マーカーはRf-1遺伝子座と3.7±1.1cMの遺伝距離を有するため、Rf-1遺伝子座との間での組換え頻度が高いという問題が十分には解決されていない。その結果、共優性マーカー自体については

5 ホモ型またはヘテロ型まで正確に検出することができるが、共優性マーカー座とRf-1遺伝子座との間で組換えが生じる場合に、Rf-1遺伝子座の遺伝子型の推定、特にホモ型またはヘテロ型までの推定を正確に実施できないという問題がある。一方、優性マーカーを使用してRf-1遺伝子座の遺伝子型を推定する場合、優性マーカーではRf-1遺伝子がホモの個体(Rf-1/Rf-1)およびヘテロの個体(Rf-1/rf-1)の両方を区別することなく検出してしま

10 まう。そのため、上記共優性マーカーと優性マーカーとを組み合わせを利用してRf-1遺伝子座の遺伝子型を推定したとしても、Rf-1遺伝子に関するホモ型とヘテロ型とを正確に識別することはできない。また、優性マーカーを用いて行うPCRでは、PCR産物が得られなかった場合には、実験操作上の問題に起因する可能性も否定できない。さらに、これらの共優性マーカーと優性マーカーとの間の遺伝的距離が約5.3cM(約1590kbp)と離れているため、Rf-1遺伝子ドナー親からの導入染色体領域長を短い長さに限定することができないので、この領域中に含まれる劣悪遺伝子の持ち込みを抑制できないという問題点も有している。

20 さらに、特開2000-139465には、イネ第10染色体のRf-1遺伝子の近傍に座乗するRFLPマーカーの塩基配列に基づいて開発された、共優性PCRマーカーが記載されている。しかしながら、それらのPCRマーカーは、依然としてRf-1遺伝子からの遺伝的距離が約1cMより離れているという問題を有している。

#### 25 発明の開示

本発明は、イネの稔性を回復する方法を提供することを目的とする。本発明の方法は、配列番号27の塩基配列を有する核酸、又は配列番号27の塩基配列と少なくとも70%同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸をイネに

導入する、ことを含む。本発明の方法は、また、配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8  
 - 5 4 1 2 3 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5  
 4 1 2 3 の塩基配列と少なくとも 70 % 同一の塩基配列であって、稔性回復機能  
 を有する核酸をイネに導入する、ことを含む。本発明の方法は、さらに、配列番  
 5 号 27 の塩基 4 2 3 5 7 - 5 3 7 4 3、より好ましくは塩基 4 2 1 3 2 - 4 8 8  
 8 3 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 4 2 3 5 7 - 5 3 7 4  
 3、より好ましくは塩基 4 2 1 3 2 - 4 8 8 8 3 の塩基配列と少なくとも 70 %  
 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸をイネに導入する、ことを  
 含む。本発明の方法は、一態様において、好ましくは、配列番号 27 の塩基配  
 10 列又は配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3 の塩基配列と、少なくとも 7  
 0 % 同一の塩基配列は、以下の条件 1) 及び 2) の少なくとも一つを満たす：

- 1) 配列番号 27 の塩基 4 5 4 6 1 に相当する塩基が A である；及び
- 2) 配列番号 27 の塩基 4 9 6 0 9 に相当する塩基が A である。

本発明はまた、被検定イネ個体又は種子が R f - 1 遺伝子を有するか否かを識  
 15 別する方法を提供することを目的とする。本発明の識別方法は、稔性回復遺伝子  
 (R f - 1 遺伝子) の機能の有無を決定する配列がイネ第 10 染色体上の多型検  
 出用マーカー座 P 4 4 9 7 M b o I と B 5 6 6 9 1 X b a I の間に存在する  
 ことを利用する。

本発明の方法は、一態様において、好ましくは、配列番号 27 の塩基配列と又  
 20 は配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3 の塩基配列と、少なくとも 70 %  
 同一の塩基配列が、以下の条件 1) 及び 2) の少なくとも一つを満たす場合に被  
 検定イネ個体又は種子が R f - 1 遺伝子を有すると判断する：

- 1) 配列番号 27 の塩基 4 5 4 6 1 に相当する塩基が A である；及び
- 2) 配列番号 27 の塩基 4 9 6 0 9 に相当する塩基が A である。

25 本発明は、さらに、R f - 1 遺伝子の稔性回復機能を抑制する方法を提供する  
 ことを目的とする。本発明の抑制方法は、一態様において、配列番号 27 の塩基  
 配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基配列と少なくとも 70 % 同一の塩基  
 配列であって、稔性回復機能を有する核酸に、対し相補的な塩基配列から選択さ  
 れる、連続した少なくとも 100 塩基の長さのアンチセンスを導入する、ことを

含む。本発明の抑制方法は、また、一態様において、配列番号 27 の塩基 385  
38-54123 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 38538  
-54123 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列であって、稔性回復  
機能を有する核酸、に対し相補的な塩基配列から選択される、連続した少なくと  
5 も 100 塩基の長さのアンチセンスを導入する、ことを含む。

本発明はさらにまた、配列番号 27 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 2  
7 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有す  
る核酸を提供することを目的とする。本発明はまた、配列番号 27 の塩基 385  
38-54123 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 38538  
10 -54123 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列であって、稔性回復  
機能を有する核酸を提供する。本発明の方法は、さらに、配列番号 27 の塩基 4  
2357-53743、より好ましくは塩基 42132-48883 の塩基配列  
を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 42357-53743、より好ましく  
は塩基 42132-48883 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列で  
15 あって、稔性回復機能を有する核酸を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、RFLP マーカー座 S12564 を起点とする染色体歩行の結果を示  
す。

20 図 2 は、BAC クローン AC068923 とラムダクローンコンティグとの位  
置関係を示す。

図 3 は、Rf-1 座極近傍組換え型花粉（いずれも稔性あり）の Rf-1 座極  
近傍の染色体構成を、その花粉から生じた 10 個体（RS1、RS2、RC1-  
8）のマーカー座の遺伝子型に基づき、明らかにした結果を示したものである。  
25 白抜き部分はジャポニカ型領域を、黒部分はインディカ型領域を示す。

図 4 は、第 10 染色体上のマーカー座と Rf-1 座との連鎖分析の結果に基づ  
き、Rf-1 座の連鎖地図上での位置を示したものである。地図距離は、104  
2F1 個体の分離データから算出した。

図5は、相補性試験によるRf-1領域の同定のために使用した、10個のゲノムクローン由来の断片を示す。染色体歩行により得られたλクローン（細い線）を用いて、太い直線で示した染色体領域について相補性試験を行った。XSF18は、欠失を含むクローンであることが分かったので、その欠失部分は点線で示した。

図6は、XSG16由来の15.7kb（実施例10）及びXSF18由来の16.2kb断片（実施例8）を用いた相補性試験の結果を示す。XSG16由来の15.7kbでは稔性が回復し、稲穂がたれている。

#### 10 発明を実施するための最良の形態

本発明者らは、まず、Rf-1の存在部位を第10染色体上の極めて狭い範囲に特定した。その結果に基づいて、Rf-1遺伝子座の近傍に存在するPCRマーカーを開発し、これらのPCRマーカーが、Rf-1遺伝子座と連鎖することを利用して、Rf-1遺伝子を検出する方法が見出された。具体的には、Rf-1遺伝子座が、イネ第10染色体上に存在するPCRマーカー座S12564 Ts p 509 I座とC1361 Mw o I座との間に座乗することを利用して、近傍に存在する新規のPCRマーカー座の遺伝子型を調査することにより、Rf-1遺伝子の有無の調査およびRf-1遺伝子ホモ型個体の選抜を実施する。当該Rf-1遺伝子を検出する方法につき、本発明者らは、平成12年8月17日に特願2000-247204として特許出願を行っている。当該出願の全内容は参考文献として本明細書に援用される。

#### I. 特願2000-247204に記載のRf-1遺伝子座の遺伝子型を推定する方法

特願2000-247204は、Rf-1遺伝子座がイネ第10染色体上のRFLPマーカー座S12564座とC1361座との間に座乗することを利用して、被検定イネ個体または種子がRf-1遺伝子を持つか否かを識別する方法について記載している。

#### マーカー

R f - 1 遺伝子座の近傍に存在する特定の領域に対して設計したプライマー対を用いて P C R を行い、その産物を特定の制限酵素で処理後電気泳動にかけると、ジャポニカ系統とインディカ系統との間で、異なる大きさのバンドが観察されることがある。そのような場合、インディカ系統に特徴的なバンドを R f - 1 連鎖バンドとする。本発明者らにより、R f - 1 遺伝子座は、イネ第 10 染色体上に存在する P C R マーカー座 S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座と C 1 3 6 1 M w o I 座との間に座乗することが明らかにされ、その周辺での P C R マーカーは当業者が適宜開発して使用可能となった。

例えば、下記の群から選択される P C R マーカーの少なくとも 1 個を被検体イネのゲノム中に存在するか否か検出することにより、被検定個体がこれらの P C R マーカーと連鎖する R f - 1 遺伝子を持つか否かを識別する：

(1) マーカー 1 : 配列番号 1 および配列番号 2 の配列を有する D N A をプライマーとして用いてゲノミック P C R を行い、得られた産物中の、制限酵素 E c o R I 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、P C R マーカー R 1 8 7 7 E c o R I ;

(2) マーカー 2 : 配列番号 3 および配列番号 4 の配列を有する D N A をプライマーとして用いてゲノミック P C R を行い、得られた産物中の、制限酵素 H i n d I I I 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、P C R マーカー G 4 0 0 3 H i n d I I I (配列番号 1 9) ;

(3) マーカー 3 : 配列番号 5 および配列番号 6 の配列を有する D N A をプライマーとして用いてゲノミック P C R を行い、得られた産物中の、制限酵素 M w o I 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、P C R マーカー C 1 3 6 1 M w o I (配列番号 2 0) ;

(4) マーカー 4 : 配列番号 7 および配列番号 8 の配列を有する D N A をプライマーとして用いてゲノミック P C R を行い、得られた産物中の、制限酵素 M w o I 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの

間の多型を検出する、PCRマーカーG 2 1 5 5 M w o I（配列番号 2 1）；

（5）マーカー 5： 配列番号 9 および配列番号 1 0 の配列を有する DNA をプライマーとして用いてゲノミック PCR を行い、得られた産物中の、制限酵素 M s p I 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカー G 2 9 1 M s p I（配列番号 2 2）；

（6）マーカー 6： 配列番号 1 1 および配列番号 1 2 の配列を有する DNA をプライマーとして用いてゲノミック PCR を行い、得られた産物中の、制限酵素 B s l I 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカー R 2 3 0 3 B s l I（配列番号 2 3）；

（7）マーカー 7： 配列番号 1 3 および配列番号 1 4 の配列を有する DNA をプライマーとして用いてゲノミック PCR を行い、得られた産物中の、制限酵素 B s t U I 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカー S 1 0 0 1 9 B s t U I（配列番号 2 4）；

（8）マーカー 8： 配列番号 1 5 および配列番号 1 6 の配列を有する DNA をプライマーとして用いてゲノミック PCR を行い、得られた産物中の、制限酵素 K p n I 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカー S 1 0 6 0 2 K p n I（配列番号 2 5）；および

（9）マーカー 9： 配列番号 1 7 および配列番号 1 8 の配列を有する DNA をプライマーとして用いてゲノミック PCR を行い、得られた産物中の、制限酵素 T s p 5 0 9 I 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカー S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I（配列番号 2 6）。

なお、上記 PCR マーカーは、R f - 1 遺伝子座が、イネ第 1 0 染色体上の 9 個の R F L P マーカー領域 R 1 8 7 7、G 2 9 1、R 2 3 0 3、S 1 2 5 6 4、

C1361、S10019、G4003、S10602、およびG2155付近に座乗する可能性が高いと考え（Fukuta et al. 1992, Jpn J. Breed. 42 (supl. 1) 164-165によるRFLP連鎖解析結果、およびHarushima et al. 1998, Genetics 148 479-494によるイネRFLP連鎖地図を参照）、これらのRFLPマーカーを、後記参考例1に記載するようにして、共優性PCRマーカーであるCAPSマーカーまたはdCAPSマーカー（Michaels and Amasino 1998, The Plant Journal 14 (3) 381-385; Neff et al. 1998, The plant Journal 14 (3) 387-392）に変換した。この変換により、上記PCRマーカーが得られた。

これらのPCRマーカーのうち、PCRマーカーR1877 EcoRI、G291 MspI（配列番号22）、R2303 BslI（配列番号23）およびS12564 Tsp509I（配列番号26）からなる群と、PCRマーカーC1361 MwoI（配列番号20）、S10019 BstUI（配列番号24）、G4003 HindIII（配列番号19）、S10602 KpnI（配列番号25）、およびG2155 MwoI（配列番号21）からなる群とは、第10染色体上でRf-1遺伝子座を挟んで反対側に存在する。

従って、一態様において、（a）PCRマーカーR1877 EcoRI、G291 MspI、R2303 BslIおよびS12564 Tsp509Iからなる群から選択される少なくとも1個のPCRマーカー、並びに（b）PCRマーカーC1361 MwoI、S10019 BstUI、G4003 HindIII、S10602 KpnI、およびG2155 MwoIからなる群から選択される少なくとも1個のPCRマーカーによりRf-1連鎖バンドを検出することにより、Rf-1遺伝子の存在を検出する。その際、上記（a）の群からRf-1遺伝子に最も近いマーカーとして、少なくともPCRマーカーS12564 Tsp509Iおよび上記（b）の群から少なくともC1361 MwoIを使用することが好ましい。被検定イネのゲノム中に、



(a) の PCR マーカーによる Rf-1 連鎖バンドと (b) の PCR マーカーによる Rf-1 連鎖バンドの両方が検出されれば、そのイネが Rf-1 遺伝子を有する可能性を高い確率で推定することができる。

別の態様においては、上記 (a) の群から少なくとも二つの PCR マーカー、  
 5 及び (b) の群から少なくとも二つの PCR マーカーにより Rf-1 連鎖バンドを検出する。例えば、(a) 及び (b) の群のマーカーのうち、図 1 に示す遺伝子地図において、Rf-1 遺伝子により近いマーカーにより Rf-1 連鎖バンドが検出され、それより Rf-1 遺伝子から遠いマーカーにより Rf-1 連鎖バンドが検出されないイネ個体を選抜することにより、Rf-1 遺伝子を有するが、  
 10 不要な遺伝子領域をできるだけ含まないイネを選抜することが可能である。この場合も、(a) 及び (b) の各群のマーカーのうち少なくとも一つは、それぞれ PCR マーカー S12564 Ts p 509 I および C1361 Mw o I であることが好ましい。すなわち、2 種の PCR マーカー座 S12564 Ts p 509 I と C1361 Mw o I は、マーカー座間距離にして 0.3 cM 離  
 15 れている。この性質を利用することにより、Rf-1 遺伝子ドナー親から導入する染色体領域を 1 cM 程度に狭めることができる。その結果、ドナー親の Rf-1 遺伝子近傍に存在する可能性がある劣悪遺伝子が回復系統に導入される可能性を最小限に抑えることができる。

#### Rf-1 遺伝子の検出

20 被検定イネゲノム中の Rf-1 遺伝子を検出するには、上記配列番号 1-18 のプライマーを用いて、被検定イネゲノムから上記 PCR マーカーのいずれかを PCR で増幅させ、ポリメラーゼ連鎖反応-制限酵素断片長多型 (PCR-RFLP) 法で検出する。PCR-RFLP 法は、比較する品種系統間において、PCR により増幅した DNA 断片配列中の制限酵素認識部位に多型が存在する場合  
 25 に、その制限酵素による切断パターンからいずれの型であるかを簡便に決定する方法である (D. E. Harry, et al., Theor Appl Genet (1998) 97:327-336)。

制限酵素による切断パターンとしては、可視化されたゲル上に、使用したプライマー対に応じて、以下の表 1 のようなバンドの存在の有無が確認される。

表 1

5	検出されるバンドの おおよそのサイズ (b p)
プライマー対 1 によるマーカー 1 の検出 (R1877 EcoRI)	
	被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 1500及び1700
	被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 1500、1700及び3200
10	被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 3200
プライマー対 2 によるマーカー 2 の検出 (G4003 HindIII)	
	被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 362
	被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 95、267及び362
15	被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 95及び267
プライマー対 3 によるマーカー 3 の検出 (C1361 MwoI)	
	被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 50及び107
	被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 25、50、79及び107
20	被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 25、50及び79
プライマー対 4 によるマーカー 4 の検出 (G2155 MwoI)	
	被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 25、27及び78
	被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 25、27、78及び105
25	被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 25及び105
プライマー対 5 によるマーカー 5 の検出 (G291 MspI)	
	被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 25、49及び55
	被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 25、49、55及び104

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 25及び104

-----  
プライマー対6によるマーカー6の検出 (R2303 BslI)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 238、655及び679

5 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 238、655、679  
及び1334

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 238及び1334

-----  
プライマー対7によるマーカー7の検出 (S10019 BstUI)

10 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 130、218及び244

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 130、218、244  
及び462

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 130及び462

-----  
15 プライマー対8によるマーカー8の検出 (S10602 KpnI)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 724

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 117、607及び724

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 117及び607

-----  
20 プライマー対9によるマーカー9の検出 (S12564 Tsp509I)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 41及び117

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 26、41、91及び117

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 26、41及び91

25

#### I I . R f - 1 遺伝子座領域の特定

以上、特願2000-247204において、Rf-1遺伝子座がDNAマーカー座S12564 Tsp509IとC1361 MwoI座との間に座乗することが本発明者らにより明らかにされ、これを利用したRFLP-PCR用マ

一カーが記載されている。R f - 1 遺伝子を持たない通常のジャポニカ品種に、戻し交雑により R f - 1 遺伝子を導入することにより回復系統が育成される。その過程で、特願 2 0 0 0 - 2 4 7 2 0 4 に記載の R f - 1 遺伝子座の識別方法を用いると、回復系統の育成が効率的（必要期間は 2 ～ 3 年）になるだけでなく、  
5 導入断片長を制御することができる。

しかしながら、交雑による導入では、R f - 1 極近傍領域をも同時に導入することは避けられない。特願 2 0 0 0 - 2 4 7 2 0 4 において、R f - 1 遺伝子座が DNA マーカー座 S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I と C 1 3 6 1 M w o I 座との間に座乗することが解明されたが、両遺伝子座は約 0. 3 c M、即ち約 9 0 k  
10 b p である。仮に R f - 1 極近傍に劣悪遺伝子が存在すれば、R f - 1 遺伝子とともにその劣悪遺伝子も導入される可能性が否定できない。

そこで、本発明者らは DNA マーカー座 S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I と C 1 3 6 1 M w o I 座の間の領域について、R f - 1 遺伝子座と DNA マーカー座 S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I とが密接連鎖することを手がかりに、染色体歩行  
15 および遺伝学的解析を行うことにより、R f - 1 遺伝子と連鎖する領域を調べた。その結果、R f - 1 遺伝子を含む R f - 1 遺伝子座領域を約 7 6 k b まで特定し、そして当該領域の全塩基配列を決定することに成功した。本発明により、B T 型雄性不稔細胞質に対する稔性回復遺伝子の機能を遺伝子工学的に導入することが可能となった。

具体的には、特願 2 0 0 0 - 2 4 7 2 0 4 では、MS コシヒカリに MS - F R コシヒカリ（R f - 1 座ヘテロ）の花粉をかけて作成した集団 1 0 4 2 個体を用いて連鎖分析を行い、R f - 1 座と S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座との間での組換え個体を 1 個体、R f - 1 座と C 1 3 6 1 M w o I 座との間での組換え個体を 2 個体見出した（本明細書中の参考例 1 - 2）。本発明では、上記集団をさ  
20 らに 4 1 0 3 個体追加し、合計 5 1 4 5 個体として解析を行った。その結果、新たに、R f - 1 座と S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座との間での組換え個体を 1 個体、R f - 1 座と C 1 3 6 1 M w o I 座との間での組換え個体を 6 個体見出し、それぞれの組換え個体の合計を 2 個体および 8 個体とした。これら 1 0 個体

を R f - 1 座極近傍組換え個体として、本発明の高精度分離分析に供試することとした（実施例 1）。

R f - 1 座と S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座との間での組換え個体が 2 個体に対し、C 1 3 6 1 M w o I 座との間での組換え個体が 8 個体という上記の組  
5 換え個体出現頻度は、S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座と C 1 3 6 1 M w o I 座とを比較すると、S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座のほうが遺伝学的に R f - 1 座に近いことを意味する。遺伝的距離（組換え価 c M が単位）と物理的距離（塩基対数 b p が単位）とは必ずしも比例しないが、通常は遺伝的距離が短ければ物理的距離も短いと期待できる。

10 そこで、S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座を起点に染色体歩行を行うことにより、R f - 1 座を単離することとした（実施例 2）。染色体歩行には、インディカ品種 I R 2 4 およびジャポニカ品種あそみのりのゲノム DNA を用いて  $\lambda$  D A S H I I

15 ベクターにより作成したゲノミックライブラリーを供試した。I R 2 4 は R f - 1 保有品種、あそみのりは R f - 1 非保有品種である。染色体歩行を進めた結果、I R 2 4 のゲノミッククローンにより約 7 6 k b の染色体領域をカバーするコンティグ（複数のクローンを重複部分で重ね合わせて染色上での順に整列化したもの）を作成することができ、その全塩基配列（7 6 3 6 3 b p）を決定した。

20 次いで、得られた塩基配列情報等を利用することにより、新たに 1 2 個のマーカーを開発し、既述の R f - 1 座極近傍組換え個体 1 0 個体を用いて、高精度分離分析を行った（実施例 3）。その結果、上記の約 7 6 k b の染色体領域に含まれる 6 5 k b の配列が R f - 1 遺伝子の機能の有無を決定する配列を包含することが示された。この領域は、8 個のゲノミッククローンから構成されるコンティグによりカバーされている。各クローンの長さは、約 1 2 ~ 2 2 k b であり少なくとも 4 . 7 k b の重複部を持つ。一方、イネの遺伝子の長さについては、短いものから長いものまでであることが知られているが、大部分の遺伝子は数 k b 以内であると考えられる。そのため、これら 8 個のゲノミッククローンのうち、少なくともひとつは完全長の R f - 1 遺伝子を包含すると予測される。

本発明者らはさらに、上記 76 kb の染色体領域のうち、Rf-1 遺伝子領域をさらに絞り込むと共に、稔性回復能の存在を直接的に証明するために、相補性試験を行った。

具体的には、雄性不稔系統である MS コシヒカリの未熟種子に、上記 76 kb 領域内の 10 個の部分断片（各 10～21 kb）を、別々に遺伝子工学的に導入した（図 5）。使用された 10 個の部分断片のうち、8 個は先に染色体歩行で得られた 8 個のゲノミッククローン（図 1、実施例 3 に記載の XSE1、XSE7、XSF4、XSF20、XSG22、XSG16、XSG8 及び XSH18）に由来するものである。これらに加えて、さらに 2 個のクローン XSF18 および XSX1 に由来する断片についても相補性試験を行った。XSF18 は XSF20 と 5' 末端及び 3' 末端（各々、配列番号 27 の塩基 20328 及び 41921）が同一だが、途中の塩基 33947-38591 を欠いている。これは、最初にクローン XSF18 が単離されたが、単離後の増殖の過程で上記欠失を生じたことが判明したため、再度増殖をやり直すことにより、完全型のクローンを単離し、XSF20 と命名したことによる（実施例 8）。また、XSX1 は、クローン XSG8 と XSH18 の重複部分がやや小さいため（約 7 kb）、制限酵素処理およびライゲーションにより両クローンから、重複部分を十分に含むようなクローンを新たに作成したものである（実施例 13）。

Rf-1 は優性遺伝子であるので、導入した断片が Rf-1 遺伝子を完全に包含している場合には、形質転換植物当代において稔性が回復する。相補性試験において、各断片について形質転換植物の種子稔性調査を行い、λファージクローン XSG16 に由来する 15.6 kb 断片（配列番号 27 の塩基 38538-54123 を含む）を導入した形質転換体において、種子稔性が回復していることが見出された（実施例 10）。他の断片については、形質転換植物はすべて不稔であった。これらの結果から、上記 15.6 kb 断片が Rf-1 遺伝子を完全に包含していることが示された。さらに、本発明により、Rf-1 遺伝子を遺伝子工学的に導入する方法が提供され、その有効性が実証された。

本発明者は、λファージクローン XSG16 のどの部分が Rf-1 遺伝子を含むかをさらに特定するために、前述の 15.6 kb 断片（配列番号 27 の塩基 3

8 5 3 8－5 4 1 2 3を含む) よりも短い断片について相補性試験による種子稔性調査を行った。その結果、X S G 1 6 に由来する 1 1 . 4 k b 断片 (配列番号 2 7 の塩基 4 2 3 5 7－5 3 7 4 3 を含む) を導入した形質転換体において、種子稔性が回復していることが見出された (実施例 1 0 (2))。さらに、より短い 6 . 8 k b 断片 (配列番号 2 7 の塩基 4 2 1 3 2－4 8 8 8 3 を含む) を導入した形質転換体においても、種子稔性が回復した (実施例 1 0 (3))。これらの結果から、上記 6 . 8 k b 断片が R f－1 遺伝子を包含していることが示された。

#### I I I . R f－1 遺伝子座を含む核酸

本発明は、稔性回復遺伝子 (R f－1) 座を含む核酸を提供する。本発明の稔性回復遺伝子 (R f－1) 座を含む核酸は、配列番号 2 7 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 2 7 の塩基配列と少なくとも 7 0 % 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸を含む。

さらに、実施例 1 0 に記載したように、配列番号 2 7 の塩基配列のうち、特に塩基 3 8 5 3 8－5 4 1 2 3 に R f－1 遺伝子が完全に含まれていると確認された。よって、本発明は特に、配列番号 2 7 の塩基 3 8 5 3 8－5 4 1 2 3 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 2 7 の塩基 3 8 5 3 8－5 4 1 2 3 の塩基配列と少なくとも 7 0 % 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸を提供する。以下、本明細書中、文脈により「配列番号 2 7 の塩基配列」という用語

は、配列番号 2 7 全体、あるいは、その一部であって稔性回復機能に関与する部分、特に、塩基 3 8 5 3 8－5 4 1 2 3 を示す。より好ましくは、塩基 4 2 3 5 7－5 3 7 4 3、さらに好ましくは、塩基 4 2 1 3 2－4 8 8 8 3 を示す。

後述する実施例では、稔性回復遺伝子 (R f－1) を含む核酸として、R f－1 遺伝子を含むインディカ米の I R 2 4 のゲノムライブラリーより核酸が単離され、配列番号 2 7 の塩基配列が決定された。しかしながら、本発明の、稔性回復遺伝子 (R f－1) を含む核酸の由来は、R f－1 遺伝子を有するインディカ型品種由来のものであれば特に限定されない。R f－1 遺伝子を有するインディカ型品種は、特に限定されず、例えば、I R 2 4、I R 8、I R 3 6、I R 6 4、Chinsurah、Boro II が含まれる。R f－1 遺伝子を有しないジャ

ポニカ型品種としては、例えば、限定されるわけではないが、あそみのり、コシヒカリ、きらら397、アキヒカリ、あきたこまち、ササニシキ、キヌヒカリ、日本晴、初星、黄金晴、ヒノヒカリ、ミネアサヒ、あいちのかおり、ハツシモ、アケボノ、フジヒカリ、峰の雪もち、ココノエモチ、ふくひびき、どんとこい、  
5 五百万石、ハナエチゼン、トドロキワセ、はえぬき、どまんなか、ヤマヒカリ等が知られている。「インディカ型品種」も「ジャポニカ型品種」も当業者に周知であり、当業者はどのようなイネ品種が本発明の対象となり得るか容易に判断できる。

本発明の核酸は、一本鎖および二本鎖型両方のDNAと共に、そのRNA相補  
10 体も含む。DNAには、例えば、ゲノムDNA（その対応するcDNAも含む）、化学的に合成されたDNA、PCRにより増幅されたDNA、およびそれらの組み合わせが含まれる。

本発明のRf-1遺伝子を含む核酸は、好ましくは配列番号27の塩基配列を有する。1つ以上のコドンが同一のアミノ酸をコードする場合があります、遺伝暗号  
15 の縮重と呼ばれている。このため、配列番号27と完全には一致していないDNA配列が、配列番号27と全く同一のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードすることがあり得る。こうした変異体DNA配列は、サイレント（silent）突然変異（例えば、PCR増幅中に発生する）から生じてよいし、または天然配列の意図的な突然変異誘発の産物であってもよい。

また、同一の機能を有するタンパク質であっても、由来する品種の相違によっ  
20 て、そのアミノ酸配列に相違が存在しうることは当業者にとって周知の事実である。本発明のRf-1遺伝子は、稔性回復機能を有する限り、配列番号27の塩基配列のこのような相同体、変異体も含みうる。「稔性回復機能を有する」とは、当該DNA断片が導入された場合に、イネ個体又は種子に稔性を付与すること  
25 を意味する。稔性回復は、Rf-1遺伝子よりタンパク質が発現されることに因ってもよく、あるいはRf-1遺伝子の核酸（DNA又はRNA）自体が稔性の付与に何らかの機能をしていてもよい。

限定されるわけではないが、Rf-1遺伝子の相同体、変異体が稔性回復機能を有するか否かは、例えば、以下のように調べることが可能である。MSコシヒ



カリ（不稔系統）にコシヒカリの花粉をかけることにより得た未熟種子を供試して、Hiei et al (Plant Journal (1994), 6

(2), p. 272-282)の方法に従い、被検定核酸断片を導入する。得られた形質転換体を通常の条件で栽培すると、被検定核酸断片が稔性回復機能を有する場合にのみ、種子が稔る。

Rf-1 遺伝子を有しないジャポニカ型のあそみのりの対応する領域に由来する核酸は、配列番号28に示した塩基配列を有する。配列番号28と配列番号27の対応する部分は、全体として約98%の同一性を有する。よって、本発明の稔性回復遺伝子（Rf-1）座を含む核酸は、配列番号27と少なくとも約70%、好ましくは約80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の同一性を有する。

同一性パーセントは、視覚的検査および数学的計算により決定してもよい。あるいは、2つの核酸配列の同一性パーセントは、Devereuxら, Nucleic Acids Res., 12:387 (1984)に記載され、そしてウィスコンシン大学遺伝学コンピューターグループ（UWGCG）より入手可能なGAPコンピュータープログラム、バージョン6.0を用い配列情報を比較することにより、決定してもよい。GAPプログラムの好ましいデフォルトパラメーターには：（1）ヌクレオチドに関する単一（unary）比較マトリックス（同一に対し1および非同一次元に対し0の値を含む）、およびSchwartzおよびDayhoff監修, Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)に記載されるような、GibbskovおよびBurgess, Nucleic Acids Res. 14:6745 (1986)の加重比較マトリックス；（2）各ギャップに対する3.0のペナルティおよび各ギャップ中の各記号に対しさらに0.10のペナルティ；および（3）末端ギャップに対するペナルティなし、が含まれる。当業者に用いられる、配列比較の他のプログラムもまた、用いてもよい。

本発明の核酸はまた、配列番号27の塩基配列に中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることが可能であり、かつ、稔性回復機能を有する核酸、並びに、配列番号27の塩基配列に高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることが可能であり、かつ、稔性回復機能を有する核酸を含む。

- 5      本明細書において使用されるように、中程度にストリンジェントな条件は、例えば、DNAの長さに基づき、一般の技術を有する当業者により、容易に決定することが可能である。基本的な条件は、Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, Vol. 1, pp. 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)に示されている。
- 10      例えば、ニトロセルロースフィルターに関し、5XSSC、0.5%SDS、1.0mM EDTA (pH8.0)の前洗浄溶液、約40℃ないし60℃での、1XSSCないし6XSSC（または約42℃での約50%ホルムアミド中の、例えばスターク溶液 (Stark's solution) などの他の同様の
- 15      のハイブリダイゼーション溶液)のハイブリダイゼーション条件、および約60℃、0.5XSSC、0.1% SDSの洗浄条件の使用が含まれる。また、例えば、ハイブリダイゼーション溶液が約50%ホルムアミドを含む場合、上記ハイブリダイゼーション温度は約15℃ないし20℃低めとなる。非常にストリンジェントな条件もまた、例えばDNAの長さに基づき、当業者により、容易に
- 20      決定することが可能である。一般に、非常にストリンジェントな条件は、上記中程度にストリンジェントな条件よりも、より高い温度及び／又はより低い塩濃度でのハイブリダイゼーション、及び／又は洗浄条件を含む、例えば、約60℃ないし65℃での0.1XSSCないし0.2XSSCのハイブリダイゼーション
- 25      条件、および／又は約65℃ないし68℃、0.2XSSC、0.1% SDSの洗浄条件を含む。当業者は温度および洗浄溶液塩濃度は、プローブの長さなどの要因にしたがい、必要に応じ調整してもよいことを認識するであろう。

同様に、本発明のDNAには、1つまたは複数の塩基の欠失、挿入または置換のため、配列番号27の塩基配列とは異なるが稔性回復機能を有する核酸を含む。稔性回復機能を有する限り、欠失、挿入または置換される塩基の数は特に制

限されないが、好ましくは1個ないし数千個、より好ましくは1個ないし千個、さらにこのましくは1個ないし500個、さらにより好ましくは1個ないし200個、最も好ましくは1個ないし100個である。

本明細書の記載に基づいてRf-1遺伝子がより特定されたならば、当業者が  
5 Rf-1遺伝子以外の部分またはRf-1遺伝子内のイントロン部分などの核酸を除いて使用することが可能である。また、既定のアミノ酸を、例えば同様の物理化学的特性を有する残基により置換してもよい。こうした保存的置換の例には、1つの脂肪族残基を互いに、例えばIle、Val、Leu、またはAlaを互いに置換するもの；LysおよびArg、GluおよびAsp、またはGln  
10 nおよびAsn間といった、1つの極性残基から別のものへの置換；あるいは芳香族残基の別のものでの置換、例えばPhe、Trp、またはTyrを互いに置換するものが含まれる。他の保存的置換、例えば、同様の疎水性特性を有する領域全体の置換が、周知である。当業者は、周知の遺伝子工学的手法により、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)等に記載の、例えば部位特異的突然変異誘発法を使用して、所望の欠失、挿入または置換を施すことが可能である。

本発明者らは、Rf-1遺伝子を有するインディカ型のIR24（塩基配列2  
20 7）と、有しないジャポニカ型のあそみのり（塩基配列28）およびGenBankに登録されている日本晴BACクローン（アクセッション番号AC068923）とを比較した。その結果、Rf-1遺伝子を含むインディカ型のRf-1領域は少なくとも、以下の1塩基多型（SNP）を有することを見出した。

- 1) 配列番号27の塩基1239に相当する塩基がAである；
- 25 2) 配列番号27の塩基6227に相当する塩基がAである；
- 3) 配列番号27の塩基20680に相当する塩基がGである；
- 4) 配列番号27の塩基45461に相当する塩基がAである；
- 5) 配列番号27の塩基49609に相当する塩基がAである；
- 6) 配列番号27の塩基56368に相当する塩基がTである；

7) 配列番号 27 の塩基 57629 に相当する塩基が C である ; 及び

8) 配列番号 27 の塩基 66267 に相当する塩基が G である。

よって、本発明の Rf-1 領域を含む核酸は、好ましくは上記条件 1) - 8) の 1 つないし全てを満たす。

5       なお、後述の実施例 3 において、Rf-1 遺伝子極近傍組換え個体 (RS1 - RS2、RC1 - RC8) についてその Rf-1 領域の染色体構成を調べた。その結果、配列番号 27 の塩基 1239 ないし 66267 の塩基配列、即ち、最大限に見積もっても P4497 Mb o I 座から B56691 Xba I 座までの領域 (約 65 kb) (図 3) に、Rf-1 遺伝子の機能の有無を決定する配列が  
10       含まれることが明らかにされた。ただし、Rf-1 遺伝子の一部の遺伝子型がインディカ型であることが、Rf-1 遺伝子の遺伝子機能発現に重要であり、残りの部分はジャポニカ型でもインディカ型でも遺伝子機能に大きな差異を生じない可能性がある。極端な場合、ジャポニカ・インディカ間でコーディング領域は完全に同一で、プロモーター領域だけに差があり、そして、プロモーター領域及  
15       びコーディング領域の一部のみが上記 P4497 Mb o I 座から B56691 Xba I 座までの領域 (約 65 kb) に含まれることもあり得る。よって、上記共有インディカ型領域 (配列番号 27 の塩基 1239 ないし 66267) が Rf-1 遺伝子全体を完全に包含するとは、断定できない。しかしながら、以下の理由、

20       1) 遺伝子の大きさは通常数 kb であり 10 kb を超えることは稀である ;  
      2) 本発明で明らかにした IR24 のゲノム塩基配列 (配列番号 27) は、上記共有インディカ型領域を完全に包含する ;

      3) 配列番号 27 の 5' 末端は、上記共有インディカ型領域の 5' 末端から 1238 bp 上流に位置し、別の遺伝子 (S12564) の一部である ; および

25       4) 配列番号 27 の 3' 末端は、上記共有インディカ型領域の 3' 末端から 10096 bp 下流に位置する

により、少なくとも配列番号 27 は Rf-1 遺伝子全体を完全に包含すると考えられる。

このように、本発明者らは、まずR f - 1 遺伝子領域を76 kbまで絞り込むことに成功した。よって、本発明のR f - 1 遺伝子領域を含む核酸は、従来技術の特開2000-139465に記載のR f - 1 遺伝子からの遺伝子距離が約1 cM (約300 kb) ある共優性マーカー座を用いて選抜した場合よりも、R f - 1 遺伝子の近傍に存在する他の遺伝子を含む可能性が格段に低い。さらに、本発明者らの先の特願2000-247204に記載のDNAマーカー座S12564 T s p 5 0 9 I とC1361 M w o I 座 (両遺伝子座の距離は約0.3 cM) を用いて選抜した場合よりも他の遺伝子を含む可能性が低い。

さらに、本発明者らは相補性試験を行うことにより、配列番号27の塩基配列のうち、特に塩基38538-54123にR f - 1 遺伝子が完全に含まれていることを確認した。よって、本発明の一態様において、配列番号27の塩基配列又は配列番号27の塩基38538-54123の塩基配列と、少なくとも70%同一の塩基配列は、以下の条件1) 及び2) の少なくとも一つを満たす：

- 1) 配列番号27の塩基45461に相当する塩基がAである；及び
- 2) 配列番号27の塩基49609に相当する塩基がAである。

#### I V. イネの稔性の回復方法

本発明は、配列番号27の塩基配列を有する核酸、又は配列番号27の塩基配列と少なくとも70%同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸をイネに導入することにより、イネの稔性を回復する方法を提供する。本発明の方法はまた、配列番号27の一部、特に、配列番号27の塩基38538-54123、好ましくは、塩基42357-53743、より好ましくは、塩基42132-48883の塩基配列を有する核酸、又は配列番号27の塩基38538-54123、好ましくは、塩基42357-53743、より好ましくは、塩基42132-48883の塩基配列と少なくとも70%同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸をイネに導入してもよい。

本発明において、イネに導入されうる稔性回復遺伝子 (R f - 1) 座を含む核酸は、先の「I I I. R f - 1 遺伝子座を含む核酸」において記載の核酸を使用しうる。核酸のイネへの導入方法は特に限定されず、公知の方法を使用することが可能である。本発明の核酸は公知の遺伝子工学的な方法によって導入しても、

あるいは交配によっても導入してもよい。隣接する他の遺伝子の導入を防げる、育種年限を短縮できる、という観点より遺伝子工学的な方法の使用が好ましい。

遺伝子工学的手法による形質導入のためにはいかなる適切な発現系を使用してもよい。組換え発現ベクターは、適切な転写または翻訳制御ヌクレオチド配列、  
5 例えば、哺乳動物、微生物、ウイルス、または昆虫遺伝子由来のものなどに、機能可能であるように連結されている、本発明のイネに導入されうる稔性回復遺伝子（Rf-1）を含む核酸を含む。

制御配列の例には、転写プロモーター、オペレーター、またはエンハンサー、mRNAリボソーム結合部位、並びに転写および翻訳開始および終結を調節する  
10 適切な配列が含まれる。ヌクレオチド配列は、制御配列が該DNA配列に機能的に関連しているとき、機能可能であるように連結されている。したがって、プロモーターヌクレオチド配列は、該プロモーターヌクレオチド配列がDNA配列の転写を調節するならば、DNA配列に、機能可能であるように連結されている。  
イネにおいて複製する能力を与える複製起点、および形質転換体を同定する選択  
15 遺伝子が、一般的に発現ベクターに取り込まれている。選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシンもしくはネオマイシン、ハイグロマイシンまたはスペクチノマイシン等の抗生物質耐性遺伝子などが例示される。

さらに、必要に応じて適切なシグナルペプチド（天然または異種性）をコード  
20 する配列を、発現ベクターに取り込んでもよい。シグナルペプチド（分泌リーダー）のDNA配列を、インフレームで本発明の核酸配列に融合させ、DNAがまず転写され、そしてmRNAがシグナルペプチドを含む融合タンパク質に翻訳されるようにしてもよい

本発明によればまた、本発明の遺伝子を含む組換えベクターが提供される。プラスミドなどのベクターに本発明の遺伝子のDNA断片を組み込む方法としては、例えば、Sambrook, J. ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1.53 (1989) に記載の方法などが挙げられる。簡便には、市販のライゲーションキッ  
25

ト（例えば、宝酒造製等）を用いることもできる。このようにして得られる組換えベクター（例えば、組換えプラスミド）は、宿主細胞であるイネに導入される。

ベクターは、簡便には当業界において入手可能な組換え用ベクター（例えば、  
5 プラスミドDNAなど）に所望の遺伝子を常法により連結することによって調製することができる。本願発明の核酸断片を用いてイネに稔性を付与する場合には、特に、植物形質転換用ベクターが有用である。植物用ベクターとしては、植物細胞中で当該遺伝子を発現し、当該タンパク質を生産する能力を有するものであれば特に限定されないが、例えば、pBI221、pBI121（以上C1o  
10 ntech社製）、及びこれらから派生したベクターが挙げられる。また、特に単子葉植物たるイネの形質転換には、pIG121Hm、pTOK233（以上Hieiら、Plant J., 6, 271-282（1994））、pSB424（Komariら、Plant J., 10, 165-174（1996））などが例示される。

15 形質転換植物は、上述のベクターの $\beta$ -グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子の部位に本願発明の核酸断片を入れ替えて植物形質転換用ベクターを構築し、これを植物に導入することで調整することができる。植物形質転換用ベクターは、少なくともプロモーター、翻訳開始コドン、所望の遺伝子（本願発明の核酸配列またはその一部）、翻訳終始コドンおよびターミネーターを含んでいることが好ましい。  
20 また、シグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、所望の遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、選抜マーカー領域などを適宜含んでもよい。プロモーター、ターミネーターは植物細胞で機能するものであれば特に限定されないが、構成的発現をするプロモーターとしては、上記ベクターに予め組み込まれている35Sプロモーターの他に、アクチン、ユビキチン遺伝子  
25 のプロモーターなどが例示される。

プラスミドを宿主細胞に導入する方法としては、一般に、Sambrook, J. ら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1.74（1989）に記載のリン酸カルシウム

法または塩化カルシウム／塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、PEGなどの化学的な処理による方法、遺伝子銃などを用いる方法などが挙げられる。植物細胞の場合は、例えばリーフディスク法 [Science, 227, 129 (1985)]、エレクトロポレーション法  
5 [Nature, 319, 791 (1986)] によって形質転換することができる。

特に植物への遺伝子導入法としては、アグロバクテリウムを用いる方法 (Horsch et al., Science, 227, 129 (1985)、Hiei et al., Plant J., 6, 271-282 (1994))、エレクトロポレーション法 (Fromm et al., Nature, 319, 791 (1986))、PEG法 (Paszkowski et al., EMBO J., 3, 2717 (1984))、マイクロインジェクション法 (Crossway et al., Mol. Gen. Genet., 202, 179 (1986))、微小物衝突法 (McCabe et al., Bio/Technology, 6, 923 (1988)) など  
10 が挙げられる。所望の植物に核酸を導入する方法であれば特に限定されない。

一方、交配による導入の場合には、例えば、以下のようにして行うことが可能である。まず、Rf-1 供与親とジャポニカ品種とを交雑して得られた  $F_1$  に、ジャポニカ品種を戻し交雑する。得られた個体のなかから、S12564 T  
20 sp509I 座がジャポニカ型ホモ、P4497 Mb o I 座及び B53627 Bst Z17I 座がヘテロの個体を選別し、さらなる戻し交雑に供試する。得られた個体のなかから、P4497 Mb o I 座及び B56691 Xba I 座がヘテロ、B53627 Bst Z17I 座がジャポニカ型ホモの個体を選抜し、さらなる戻し交雑に供試する。以後は、戻し交雑各世代で、P4497 Mb o  
25 I 座及び B56691 Xba I 座がヘテロの個体を選抜し、次の戻し交雑に供試する、という工程を10回程度繰り返す。最後に、P4497 Mb o I 座及び B56691 Xba I 座がヘテロの個体を自殖させ、得られた個体から両座がインディカ型ホモの個体を選抜することにより、P4497 Mb o I 座から



B 5 6 6 9 1 X b a I 座までの限定された染色体領域を R f - 1 供与親から引き継ぐ回復系統を得ることができる。

本発明において、稔性回復遺伝子 (R f - 1) を含む核酸が単離されたことにより、R f - 1 遺伝子を遺伝子工学の技術を用いてイネ品種に導入し、回復系統を育成することが可能となった。本発明では R f - 1 領域を 7 6 k b 以下にまで絞り込むことに成功した。よって本発明の R f - 1 遺伝子座を含む核酸は、従来技術と比較して、R f - 1 遺伝子の近傍に存在する他の遺伝子を含む可能性が格段に低い。さらに、本発明は R f - 1 遺伝子を含む領域の全塩基配列を明らかにした。当業者は、本明細書の記載に基づき R f - 1 遺伝子自体の解析を進めることができる。よって、隣接する遺伝子を全く含まずに R f - 1 遺伝子のみを導入することも可能となった。これは、隣接遺伝子が劣悪形質をもたらす遺伝子である場合に特に重要である。さらに、交雑の場合より早く、1 ~ 2 年の短期間での回復系統を育成も可能となった。

そして、本明細書中の実施例 4 - 1 3 に記載の相補性試験では実際に、図 5 に記載の 1 0 個のクローン由来の断片を用い、アグロバクテリウムを用いる方法により MS コシヒカリ (B T 細胞質を持ち、核遺伝子は コシヒカリ とほぼ同一) を形質転換した。その結果、配列番号 2 7 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3、好ましくは、塩基 4 2 3 5 7 - 5 3 7 4 3、より好ましくは、塩基 4 2 1 3 2 - 4 8 8 8 3 の塩基配列を含む核酸によって、稔性回復系統が育成されることが証明された。

限定されるわけではないが、アグロバクテリウムを用いるイネの回復系統の作成方法は、例えば、H i e i e t a l . , P l a n t J . , 6 , p . 2 7 1 - 2 8 2 ( 1 9 9 4 ) 、 K o m a r i e t a l . , P l a n t J . , 1 0 , p . 1 6 5 - 1 7 4 ( 1 9 9 6 ) 、 D i t t a e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 7 7 : p . 7 3 4 7 - 7 3 5 1 ( 1 9 8 0 ) 等に記載されている。

まず、所期の挿入したい核酸断片を含むプラスミドベクターを作成する。プラスミドベクターは、例えば、前記 K o m a r i e t a l . , P l a n t J . , 1 0 , p . 1 6 5 - 1 7 4 ( 1 9 9 6 ) らにプラスミドマップが記載さ

れている、pSB11、pSB22等が使用可能である。あるいは、当業者は例えば前記pSB11、pSB22等のプラスミドベクターを基に、自ら適当なベクターを構築する事も可能である。本明細書後述する実施例では、pSB11を基に、ハイグロマイシン耐性遺伝子カセットを持つ中間ベクターpSB200を  
5 作成して使用した。具体的には、先ず、ユビキチンプロモーターとユビキチンイントロン (Pubi-ubiI) に、ノパリン合成酵素のターミネーター (Tnos) を接続した。これより得られたPubi-ubiI-Tnos接続体のubiI-Tnos間に、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (HYG (R)) を挿入することにより、Pubi-ubiI-HYG (R) -Tnosからなる接続体を得た。この接続体を、pSB11 (Komariら、上述) のHindIII/  
10 EcoRI断片に接続することにより、pKY205を得た。このpKY205のPubi上流に存在するHindIII部位にNotI、NspV、EcoRV、KpnI、SacI、EcoRIの制限酵素部位を追加するためのリンカー配列を挿入することにより、ハイグロマイシン耐性遺伝子カセットを有するpSB  
15 B200を得た。

次いで、挿入核酸を含む組換えベクターを用いて大腸菌 (例えばDH5α、JM109、MV1184等、いずれも例えばTAKARA社より購入可能) を形質転換する。

さらに、形質転換された大腸菌を用いて、アグロバクテリウム菌株を好ましくはヘルパー大腸菌株とともに、例えば、Ditta et al (1980) の方法に従い、三菌系交雑 (triparential mating) を行う。限定されるわけではないが、アグロバクテリウムは例えば、Agrobacterium tumefaciens菌株LBA4404/pSB1、LBA4404/pNB1、LBA4404/pSB3等を使用することが可能である。い  
20 ずれも前述のKomari et al., Plant J., 10, p. 165-174 (1996) にプラスミドマップが記載されており、当業者は例えば自らベクター構築を行うことにより使用可能である。限定されるわけではないが、ヘルパー大腸菌は、例えばHB101/pRK2013 (クローンテック社より入手可能) 等が使用可能である。また、より一般的ではないがpRK20

73を保有する大腸菌もヘルパー大腸菌として使用可能との報告がある（L e m a s e t a l . , P l a s m i d 1992, 27, p. 161-163）。

次いで、所期の交配が生じたアグロバクテリウムを用いて、例えば、H i e i e t a l （1994）の方法に準拠し、雄性不稔イネの形質転換を行う。形質転換に必要なイネ未熟種子は、例えば、雄性不稔イネにジャポニカ品種の花粉をかけることにより作成できる。

形質転換植物の稔性回復は、例えば出穂約1か月後に、種子稔性を立毛調査することによって調べることが可能である。立毛調査とは、圃場などで栽培されている状態で観察する方法である。あるいは、実験室で穂の稔実率を調べる稔実率調査を行ってもよい。

#### V. R f - 1 遺伝子の存在の有無の識別方法

本発明においてR f - 1 遺伝子の機能の有無を決定する配列が、イネ第10染色体上の約65kbの多型検出用マーカー座P4497 Mb o I とB56691 X b a I の間に存在することが明らかにされた。さらに、相補性試験により、配列番号27の塩基配列のうち、特に塩基38538-54123にR f - 1 遺伝子が完全に含まれていることが確認された。

また、R f - 1 遺伝子を有するインディカ型品種（I R 24）（配列番号27）と当該遺伝子を有しないジャポニカ型品種（あそみのり（配列番号28）および日本晴BACクローンAC068923）の塩基配列を比較し、両者に複数の多型（p o l y m o r p h i s m）が存在することが明らかになった。その結果、R f - 1 遺伝子近傍領域における塩基配列の多型を利用することにより、被検定イネ個体又は種子がR f - 1 遺伝子を有するか否かを、簡便、迅速かつ正確に識別することが可能となった。

よって、本発明はまた、R f - 1 遺伝子の機能の有無を決定する配列がイネ第10染色体上の多型検出用マーカー座P4497 Mb o I とB56691 X b a I の間に存在することを利用して、被検定イネ個体又は種子がR f - 1 遺伝子を有するか否かを識別する方法を提供する。

多型の検出は公知の任意の方法を使用して行うことが可能である。例えば、制限酵素断片長の多型 (restriction fragment length polymorphism; RFLP) を調べる方法、塩基配列の決定により直接的に決定する方法、ゲノムDNAを8塩基認識制限酵素で切断後、末端を放射能標識し、さらに、6塩基および4塩基認識制限酵素で切断し、2次元電気泳動で展開する方法 (RLGS法、Restriction Landmark Genome Scanning) 等が知られている。さらに、RFLPをポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって増幅・検出する AFLP (amplified fragment length polymorphism; P. Vos, ら、Nucleic Acids Res. Vol. 23, p. 4407-4414 (1995)) 分析も開発されている。

例えば、従来より以下に例示するようなRFLPをPCR増幅を用いて検出する方法 (RFLPマーカーのPCRマーカー化)、マイクロサテライトの多型をPCR増幅を用いて検出する方法 (マイクロサテライトマーカー) が採用されてきた。

#### RFLPマーカーのPCRマーカー化

A. RFLPプローブ対応ゲノム領域の多型を利用してPCRマーカー化する方法 (D. E. Harry, B. Temesgen, D. B. Neale; Codominant PCR-based markers for Pinus taeda developed from mapped cDNA clones, Theor. Appl. Genet. (1998) 97: p. 327-336)。これは、RFLPマーカープローブ配列 (「RFLP」は、あるDNA断片をプローブに用いてサザン解析を行った場合に観察される多型である。プローブに用いたDNA断片の塩基配列を「RFLPマーカープローブ配列」と呼ぶ。) に対して設計したプライマーを用いてゲノムPCRを行った後、次の二方法のいずれかによりPCRマーカー化できる。第1は、産物を一連の制限酵素で処理し、断片長多型を生じる制限酵素を探索する手法であり、第2は、産物の塩基配列を品種間比較して多型を探索し、その多型を利用してPCRマーカー化する方法である。

B. RFLP原因部位を同定してPCRマーカー化する方法。これは、RFLPマーカープローブ配列内あるいはその周辺（通常数kb以内）に存在するRFLP原因部位（比較する2品種の一方のみが持つ制限酵素認識部位）を同定することにより、PCRマーカー化する方法である。

#### 5 マイクロサテライトマーカー

マイクロサテライトとは、 $(CA)_n$ のような2ないし4塩基程度の繰り返し配列であり、ゲノム中に多数存在している。繰り返し数に品種間多型がある場合、隣接領域に設計したプライマーを用いてPCRを行うと、PCR産物長に多型が観察され、DNA多型を検出することが可能となる。マイクロサテライトを利用した多型検出マーカーは、マイクロサテライトマーカーと呼ばれている  
10 (O. Parnaud, X. Chen, S. R. McCouch, , Mol. Gen. Genet. (1996) 252: p. 597-607)。

本発明において多型の検出方法は特に限定されない。効率、簡便性の観点より、PCRとRFLPを組み合わせ、比較する品種系統間において、PCRにより増幅したDNA断片配列中の制限酵素認識部位に多型が存在する場合に、その制限酵素による切断パターンからいずれの型であるかを決定するPCR-RFLP法が好ましい。PCR-RFLP法は、CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) 法とも呼ばれる。多型が見出される部位に適当な制限酵素認識部位が存在しない場合、PCRの際  
15 に制限酵素部位を導入するCAPSの修飾法、dCAPS (derived cleaved amplified polymorphic sequence) も使用可能である (Michaels, S. D. and Amasino, R. M. (1998), The Plant Journal 14 (3) 381-385; A. Koniecznyら, (1993), Plant J. 4 (2) p. 403-410; Neff, M. M., Neff, J. D., Chory, J. and Pepper, A. E. (1998), The Plant Journal 14 (3) 387-392)。以下、より詳細に説明する。

#### 20 CAPS法、dCAPS法

限定されるわけではないが、本発明の識別方法では

i) R f - 1 遺伝子座において、インディカ品種とジャポニカ品種の塩基配列において多型が見出される部位およびその隣接領域の塩基配列に基づいて、当該塩基配列を増幅するようにプライマー対を作成し；

5      i i) 被検定イネ個体又は種子のゲノムDNAを鋳型として核酸増幅反応を行い；そして

i i i) 前記核酸増幅産物に見出される多型に基づいて、被検定イネ個体又は種子がR f - 1 遺伝子を有するか否かを判断する。

工程 i) におけるプライマー対の作成は、好ましくは

10      a) 前記核酸増幅産物の多型中に欠失領域を有する型が存在する場合、当該欠失領域の両側に欠失領域を挟むように核酸増幅用プライマー対を作成し、多型検出用マーカーとする；

b) 前記核酸増幅産物の多型中に制限酵素認識に差異を生じる塩基置換が存在する場合、当該塩基置換部位の両側に置換部位を挟むように核酸増幅用プライマー対を作成し、多型検出用マーカーとする；または

15      c) 前記核酸増幅産物の多型中に制限酵素認識に差異を生じない塩基置換が存在する場合、当該塩基置換部位を含み、そして、当該塩基置換部位を含む領域を核酸増幅産物では制限酵素認識に差異を生じるような塩基配列に変更するようなミスマッチ導入用プライマー対を作成し、多型検出用マーカーとする；

20      のいずれかの手段を含む。

限定されるわけではないが、本発明において、R f - 1 遺伝子の存在を識別するために利用可能な適当な多型部位は、例えば、R f - 1 遺伝子を有するインディカ型品種 (I R 2 4) (配列番号 2 7) と当該遺伝子を有しないジャポニカ型品種 (あそみのり (配列番号 2 8) および B A C クローン A C 0 6 8 9 2 3) の塩基配列を比較し、以下のように多型検出用マーカーの作成が可能となるように、適宜選択することができる。

25      例えば、見出された多型が制限酵素認識部位に差異を生じる場合、当該多型部位の両側に多型部位を挟むように核酸増幅プライマーを作成し、多型検出用に用いる。プライマーを設計する際は、不要な産物を避けるために、反復性の高い配

列に対して設計しない方が好ましい。見出された多型が制限酵素認識に差異を生じない場合、記述の d C A P S 法を適用することにより、マーカーを作成することができる。d C A P S マーカーのプライマーを設計する際は、反復配列に対して設計しない方が好ましいことに加え、多型を識別しやすするため産物長が、  
5 好ましくは 50－300 塩基、より好ましくは 100 塩基程度となるようにするとよい。

見出された多型がマイクロサテライトに関するものであれば、当該マイクロサテライトを挟むように核酸増幅用プライマーを作成し、多型検出用に用いる。この場合も、反復配列に対してプライマーを設計しない方が好ましい。

10 1) 核酸増幅

本発明では、好ましくは、解明された被検定イネ個体又は種子の R f - 1 遺伝視座の核酸配列の塩基配列に基づいて、多型を含む隣接領域を増幅するようにプライマー対を作成する。当該プライマーを使用して、被検定イネ個体又は種子のゲノム DNA を鋳型に核酸増幅反応を行う。核酸増幅反応は好ましくは、複製連鎖反応 (P C R) (サイキら、1985, S c i e n c e 230, p. 135  
15 0－1354) である。

核酸増幅のためのプライマー対は、多型部位およびその隣接領域の塩基配列に基づき公知の方法により作成することが可能である。具体的には、限定されるわけではないが、例えば、多型部位およびその隣接領域の塩基配列に基づき、以下の条件：  
20

- 1) 各プライマーの長さが 15－30 塩基であること；
- 2) 各プライマーの塩基配列中の G + C の割合が 30－70 % であること；
- 3) 各プライマーの塩基配列中の A、T、G および C の分布が部分的に大きく偏らないこと；

25 4) プライマー対によって増幅される核酸増幅産物の長さが 50－3000 塩基、好ましくは 50－300 塩基であること；そして

5) 各プライマー自身の塩基配列中、又はプライマー同士の塩基配列間に相補的な配列部分が存在しないこと

を満たすように、多型部位およびその隣接領域の塩基配列と同じ塩基配列若しくは上記領域に相補的な塩基配列を有する一本鎖DNAを製造し、または、必要であれば多型部位およびその隣接領域の塩基配列に対する結合特異性を失わないように修飾した上記一本鎖DNAを製造する

- 5      ことを含む方法により、プライマー対を作成できる。

本発明において増幅される、多型部位の「隣接領域」とは、多型とその隣接領域の双方を含む領域が、好ましくは、PCR法等の核酸増幅が可能な距離の範囲内にあることを意味する。限定されるわけではないが、好ましくは増幅される隣接領域が約50塩基ないし約3000塩基、より好ましくは約50塩基ないし約2000塩基の範囲内にある。多型を識別しやすするためには、産物長が好ましくは50-300塩基、より好ましくは100塩基程度となるようにするとよい。限定されるわけではないが、隣接領域は、多型部位の5'側または3'側に好ましくは約0塩基ないし約3000塩基、より好ましくは約0塩基ないし約2000塩基、より好ましくは約0塩基ないし約1000塩基の範囲内にある。

- 15      核酸増幅反応の手順及び条件は特に限定されず、当業者に周知である。当業者は、多型部位およびその隣接領域の塩基配列、プライマー対の塩基配列および長さ等の種々の要因に応じて適宜、条件を採用することが可能である。一般には、プライマー対の長さが長い程、G+Cの割合が高いほど、A、T、GおよびCの分布の偏りが小さい程よりストリンジントな条件（より高温でのアニーリング反応および核酸伸長反応、より少ないサイクル数）で核酸増幅反応を行うことが可能である。よりストリンジントな条件の採用により、特異性の高い増幅反応が可能となる。

- 25      増幅反応は、限定されるわけではないが、例えば、鋳型として使用するゲノムDNA 50 ng、dNTP各200  $\mu$ M、Ex Taq<sup>TM</sup> (TAKARA) 5 Uを使用し、例えば、94℃にて2分を1サイクル行った後、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて2分を1サイクルとして30サイクル行い、最後に72℃にて2分を1サイクル行うことにより行うことができる。あるいは、94℃にて2分を1サイクル行った後、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて1分を1サイクルとして30サイクル行い、最後に72℃にて2分を1サイクル



行うことにより行うこともできる。あるいは、別の態様においては、94℃にて2分を1サイクル行った後、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとして35サイクル行い、最後に72℃にて2分を1サイクル行うことにより行うこともできる。

- 5      PCRの鋳型として使用する被検定イネゲノムのDNAは、Edwardsら (Nucleic Acids Res. 8(6): 1349, 1991) の方法で、個体又は種子より簡易に抽出することができる。より好ましくは、標準的な方法により精製したDNAを用いるのがよい。CTAB法 (Mur  
10      ray M. G., et al., Nucleic Acids Res. 8(19): 4321-5, 1980) は、特に好ましい抽出法である。PCRを行うための鋳型として使用するDNAの濃度は、終濃度で0.5 ng/ $\mu$ l が好ましい。

## 2) 多型検出用マーカの作成

- 15      上記プライマー対を用いた核酸増幅反応により、増幅産物に多型が検出されるか否かを調査し、見出された多型に基づいて多型検出用マーカを作成する。限定されるわけではないが、増幅産物に検出されうる多型としては以下のようなものがある。

### a) 前記核酸増幅産物の多型中に欠失領域を有する型が存在する場合

- 20      このような場合、欠失領域の両側に欠失領域を挟むように核酸増幅用プライマー対を作成し、多型検出用マーカとする。欠失領域の大きさが十分な場合、例えば増幅産物をアガロースゲル電気泳動又はアクリルアミドゲル電気泳動等することにより、泳動度の差により多型の検出が可能である。例えば、アガロースゲル電気泳動の場合には塩基対数に約5%以上の差がある場合、シーケンス用アクリルアミドゲル電気泳動の場合には約1塩基以上長さに差がある場合検出可能で  
25      ある。または、欠失領域外の塩基配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはDNA断片を解析用プローブとして、核酸増幅産物に対してハイブリダイゼーションを行うことにより、多型を検出することができる。あるいは、必要に応じ、増幅産物の塩基配列を決定して多型を確認してもよい。核酸の電気泳動、ハイブリダイゼーション、塩基配列の決定等は公知の方法を使用でき、当業

者は適宜採用可能である。このような場合は、増幅産物の長さの相違が直接多型を生じるので、これを利用した多型検出用マーカーをALP (amplicon length polymorphism) マーカーと言う。

5 b) 前記核酸増幅産物の多型中に制限酵素認識に差異を生じる塩基置換が存在する場合

このような場合、当該塩基置換部位の両側に置換部位を挟むように核酸増幅用プライマー対を作成し、多型検出用マーカーとする。このような場合、核酸増幅産物の多型中に制限酵素認識に差異を生じる塩基置換が存在する、即ち、核酸増幅産物中に、特定の1または複数の制限酵素で切断されるものとされないものが  
10 存在する。よって、得られた増幅産物を制限酵素処理し、例えばアガロースゲル等で電気泳動し、泳動度の差により多型を検出することが可能である。必要に応じ、増幅産物の塩基配列を決定して多型を確認してもよい。

このような場合、PCR等による増幅産物の制限酵素断片の長さの相違が多型を生じるので、これを利用した多型検出用マーカーをCAPSマーカーまたはP  
15 CR-RFLPマーカーという (A. Koniecznyら, 上述)。

後述する実施例1のプライマー対P4497 MboI、P23945 MboI、P41030 TaqI、P45177 BstUI、B59066 BsaJI及びB56691 XbaIがこのような場合に相当する。なお、前記  
20 a) の核酸増幅産物の長さで多型を検出可能な場合であっても制限酵素処理を併用することにより、多型がより検出しやすくなる場合がある。

c) 前記核酸増幅産物の多型中に制限酵素認識に差異を生じない塩基置換が存在する場合

このような場合、当該塩基置換部位を含み、そして、当該塩基置換部位を含む領域を核酸増幅産物では制限酵素認識に差異を生じるような塩基配列に変更する  
25 ようなミスマッチ導入プライマー対を作成し、多型検出用マーカーとする。

具体的には、天然のRf-1遺伝子近傍領域の塩基配列に基づくプライマー対では核酸増幅産物に多型を生じるが制限酵素認識に差異を生じないため、片方のまたは双方のプライマーにミスマッチを導入し、当該塩基置換部位(多型)を含む領域を核酸増幅産物では制限酵素認識に差異を生じるような塩基配列に変更す

る。例えば、PCR法を用いた部位特異的変異の導入による特定ヌクレオチドの置換、欠失又は付加の一般的な技術は、例えばMikaelianら、Nucleic Acids Res. 20:376, 1992に記載された方法を用いることができる。上記ミスマッチ導入プライマーを多型検出用マーカーとして用いた増幅産物では、ミスマッチ導入部位において制限酵素認識に差異を有するため、核酸増幅産物中に、特定の1または複数の制限酵素で切断されるものとされないものが存在する。よって、上述のb)の場合と同様に得られた増幅産物を制限酵素処理し、例えばアガロースゲル等で電気泳動し、泳動度の差により多型を検出することが可能である。

- 10 ミスマッチの導入は、プライマーの標的植物ゲノムへの結合性を失わせず、また、多型を生じている塩基置換を変化させるものであってもならない。多型を生じている塩基置換を利用してその近傍にミスマッチを導入して、塩基置換とミスマッチの双方の組み合わせにより制限酵素認識に差異が生じるようにする。このようなミスマッチの導入法は当業者に公知であり、例えば、Michaels, S. D. and Amasino, R. M. (1998)、Neff, M. M., Neff, J. D., Chory, J. and Pepper, A. E. (1998)等に詳述されている。

このような場合のマーカーは、前述のb)のCAPSマーカーの改良であり、dCAPS (derived CAPS) マーカーという。後述する実施例3のP9493 Bsl Iがこのような場合に相当する。

- 20 なお、上記のb)またはc)の場合において、品種間の多型とは無関係の余分な制限酵素部位が多く存在すると、多型に基づく制限酵素部位認識の相違が識別しにくくなる場合がある。このような場合、必要に応じプライマーにミスマッチを導入し、不必要な制限酵素部位をつぶしてもよい。例えば、実施例3のB60304 Msp Iでは、Rプライマーにミスマッチを導入して多型と無関係なMsp I部位をつぶしている。

限定されるわけではないが、CAPS法又はdCAPS法は、他のRFLP法等と比較していくつかの利点を有する。具体的には、例えば、RFLP法と比較して、少量のサンプルで分析できる。分析に要する時間および労力を大きく軽減

できる、といった利点がある。マイクロサテライトマーカ―と比較しても、作成したPCRマーカ―の多型検出がアクリルアミド電気泳動よりも容易なアガロースゲル電気泳動で行えるという利点がある。

#### 本発明の識別方法の好ましい実施態様

5 以下、例示のために本発明の被検定イネがRf-1遺伝子を有するか否かを識別する方法の好ましい態様を記載する。本明細書の実施例においてRf-1遺伝子を有するインディカ型品種IR24の塩基配列（配列番号27）において、ジャポニカ型品種の対応する領域と比較した結果、少なくとも以下の1）-8）の多型を有することを見出した。

- 10 1) 配列番号27の塩基1239に相当する塩基がAである；
- 2) 配列番号27の塩基6227に相当する塩基がAである；
- 3) 配列番号27の塩基20680に相当する塩基がGである；
- 4) 配列番号27の塩基45461に相当する塩基がAである；
- 5) 配列番号27の塩基49609に相当する塩基がAである；
- 15 6) 配列番号27の塩基56368に相当する塩基がTである；
- 7) 配列番号27の塩基57629に相当する塩基がCである；及び
- 8) 配列番号27の塩基66267に相当する塩基がGである。

よって、本発明の好ましい実施態様において、上記1）-8）の条件のいずれか1つないし全部を満たす場合に、被検定イネの個体又は種子がRf-1遺伝子を有すると判断する。

さらに、本発明者らは配列番号27の塩基配列のうち、特に塩基38538-54123、好ましくは、塩基42357-53743、より好ましくは、塩基42132-48883にRf-1遺伝子の機能発現に必須の領域が含まれていることを確認した。よって、本発明の一態様において、配列番号27の塩基配列  
25 又は配列番号27の塩基38538-54123の塩基配列と、少なくとも70%同一の塩基配列が、以下の条件1) 及び2) の少なくとも一つを満たす場合に、被検定イネの個体又は種子がRf-1遺伝子を有すると判断する：

- 1) 配列番号27の塩基45461に相当する塩基がAである；及び
- 2) 配列番号27の塩基49609に相当する塩基がAである。

上記の条件を満たすか否かは、公知の多型の検出方法を使用することが可能である。上記配列を含む隣接領域の塩基配列を直接決定してもよい。しかしながら、迅速性、簡便性の観点より、上述したCAPS法又はdCAPS法を採用することが好ましい。CAPS法又はdCAPS法は、例えば以下のように行うことが可能である。

i) 以下のいずれかの塩基、

- 1) 配列番号27の塩基1239に相当する塩基；
- 2) 配列番号27の塩基6227に相当する塩基；
- 3) 配列番号27の塩基20680に相当する塩基；
- 4) 配列番号27の塩基45461に相当する塩基；
- 5) 配列番号27の塩基49609に相当する塩基；
- 6) 配列番号27の塩基56368に相当する塩基；
- 7) 配列番号27の塩基57629に相当する塩基；及び
- 8) 配列番号27の塩基66267に相当する塩基

を含む隣接領域の塩基配列に基づいて、上記塩基と隣接領域の双方を増幅するようにプライマー対を作成し；

ii) 被検定イネ個体又は種子のゲノムDNAを鋳型として核酸増幅反応を行い；そして

iii) 前記核酸増幅産物に見出される多型に基づいて被検定イネ個体又は種子がRf-1遺伝子の有無を識別する。

核酸増幅反応産物の多型の検出は、限定されるわけではないが、例えば以下の1) - 8) の1つないし全てを満たす場合に被検定イネ個体又は種子がRf-1遺伝子を有すると判断する、ことにより行う。

1) 配列番号27の塩基1239に相当する塩基を含む領域が、MboI認識配列を有しない；

2) 配列番号27の塩基6227に相当する塩基を含む領域が、BslI認識配列を有しない；

3) 配列番号27の塩基20680に相当する塩基を含む領域が、MboI認識配列を有する；

4) 配列番号 27 の塩基 4 5 4 6 1 に相当する塩基を含む領域が、T a q I 認識配列を有しない；

5) 配列番号 27 の塩基 4 9 6 0 9 に相当する塩基を含む領域が、B s t U I 認識配列を有しない；

5 6) 配列番号 27 の塩基 5 6 3 6 8 に相当する塩基を含む領域が、M s p I 認識配列を有しない；

7) 配列番号 27 の塩基 5 7 6 2 9 に相当する塩基を含む領域が、B s a J I 認識配列を有しない；及び

8) 配列番号 27 の塩基 6 6 2 6 7 に相当する塩基を含む領域が、X b a I 認識配列を有しない。

ただし、上記 1) - 8) の領域の各多型を検出可能な制限酵素であれば、上記に限定されるものではない。

本発明の識別方法は、好ましくは、

i) 以下のいずれかの塩基、

15 1) 配列番号 27 の塩基 4 5 4 6 1 に相当する塩基；又は

2) 配列番号 27 の塩基 4 9 6 0 9 に相当する塩基；

を含む隣接領域の塩基配列に基づいて、上記塩基と隣接領域の双方を増幅するようにプライマー対を作成し；

20 i i) 被検定イネ個体又は種子のゲノム DNA を鋳型として核酸増幅反応を行い；そして

i i i) 前記核酸増幅産物に見出される多型に基づいて被検定イネ個体又は種子が R f - 1 遺伝子の有無を識別する。限定されるわけではないが、工程 i i

i) が、以下の条件 1) 及び 2) の少なくとも一つを満たす場合に被検定イネ個体又は種子が R f - 1 遺伝子を有すると判断する：

25 1) 配列番号 27 の塩基 4 5 4 6 1 に相当する塩基を含む領域が、T a q I 認識配列を有しない；及び

2) 配列番号 27 の塩基 4 9 6 0 9 に相当する塩基を含む領域が、B s t U I 認識配列を有しない。

増幅反応に使用するプライマー対は、配列番号 27 の塩基配列に基づき、好ましくは前述した条件を満たすように当業者が適宜選択可能である。好ましくは、配列番号 39 及び 40、配列番号 41 及び 42、配列番号 43 及び 44、配列番号 45 及び 46、配列番号 47 及び 48、配列番号 49 及び 50、配列番号 51 及び 52、並びに配列番号 53 及び 54 からなるグループから選択される塩基配列を有するいずれかのプライマー対を使用する。より好ましくは、プライマー対は、配列番号 45 及び 46、並びに配列番号 47 及び 48 からなるグループから選択される。または、必要であれば上記プライマー対の配列に基づき、多型部位およびその隣接領域の塩基配列に対する結合特異性を失わないように置換、欠失又は付加を施した配列をプライマーとして採用することも可能である。

得られた PCR 産物を、制限酵素断片長多型に関して調べるため、それぞれの PCR マーカーに存在する制限部位に対応する制限酵素で切断する。この切断は、用いる制限酵素の推奨反応温度で数時間～一昼夜インキュベーションすることにより行う。制限酵素で切断したそれぞれの増幅 PCR サンプルは、例えば約 0.7% ないし 2% アガロースゲルあるいは約 3% の MetaPhor<sup>TM</sup> アガロースゲルで電気泳動することにより解析する。例えば、ゲルをエチジウムブロマイド中紫外線下で可視化する。

本発明の最も好ましい態様において、制限酵素による切断パターンとしては、可視化されたゲル上に、使用するプライマー対に応じて、以下の表 2 のようなバンドの存在の有無が確認される。

表 2

-----			
			検出されるバンドの おおよそのサイズ (bp)
-----			
P4497	MobI による増幅	制限酵素	MboI
(配列番号 39 および 40)			
被検定イネゲノムが Rf-1 遺伝子を有する場合 (ホモ) :			730

有しない場合: 3 8 5、3 4 5

-----  
P 9 4 9 3 B s l I による増幅 制限酵素 B s l I

(配列番号 4 1 および 4 2)

5 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を有する場合 (ホモ) : 1 2 6

有しない場合: 1 0 0、2 6

-----  
P 2 3 9 4 5 M b o I による増幅 制限酵素 M b o I

(配列番号 4 3 および 4 4)

10 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を有する場合 (ホモ) : 1 6 0、1 0 0

有しない場合: 2 6 0

-----  
P 4 1 0 3 0 T a q I による増幅 制限酵素 T a q I

(配列番号 4 5 および 4 6)

15 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を有する場合 (ホモ) : 2 8 0

有しない場合: 9 0、1 9 0

-----  
P 4 5 1 7 7 B s t U I による増幅 制限酵素 B s t U I

(配列番号 4 7 および 4 8)

20 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を有する場合 (ホモ) : 20, 65, 730

有しない場合: 20, 65, 175, 555

-----  
B 6 0 3 0 4 M s p I による増幅 制限酵素 M s p I

(配列番号 4 9 および 5 0)

25 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を有する場合 (ホモ) : 3 3 0

有しない場合: 2 2 0、1 1 0

-----  
B 5 9 0 6 6 B s a J I による増幅 制限酵素 B s a J I

(配列番号 5 1 および 5 2)



被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を有する場合（ホモ）： 4 2 0

有しない場合： 6 5、3 5 5

-----  
B 5 6 6 9 1 X b a I による増幅 制限酵素 X b a I

5 (配列番号 5 3 および 5 4)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を有する場合（ホモ）： 6 7 0

有しない場合： 1 4 0、5 3 0

-----

- 10 なお、後述の実施例 3 において、花粉稔性を有する R f - 1 遺伝子極近傍組換え個体（R S 1 - R S 2、R C 1 - R C 8）について、上記 8 種のプライマー対を含めた 1 4 種の多型マーカーを使用して、R f - 1 領域の染色体構成を調べた。その結果、いずれの個体も P 9 4 9 3 B s l I ないし 5 9 0 6 6 B s a J I の間については、インディカ型品種由来の R f - 1 遺伝子を有することが確認された。この結果から、図 3 で示したような染色体構成をもつ組換え型花粉において、花粉の受精能力があること、すなわち、R f - 1 遺伝子が機能していることが示された。これは、これらの組換え型花粉が共有するインディカ型領域、すなわち、最大限に見積もっても P 4 4 9 7 M b o I 座から B 5 6 6 9 1 X b a I 座までの領域（約 6 5 k b）に、R f - 1 遺伝子の機能の有無を決定する
- 15
- 20 配列が含まれることを意味する。

- なお、本発明では、交雑による個体の出現頻度から S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座と R f - 1 座とが非常に近接しているとの予測に基づき、染色体歩行を始めた。実際、本発明の高精度分離分析の結果、両座の遺伝的距離は約 0. 0 4 c M と算出された。現在公知となっている R f - 1 座連鎖マーカーのなかで、最も
- 25 密接に連鎖しているマーカーは、先述の特開 2 0 0 0 - 1 3 9 4 6 5 に記載されているマーカーのひとつであるが、そのマーカーでも R f - 1 座との遺伝的距離は 1 c M と記載されている。イネの場合、平均すると 1 c M は 3 0 0 k b に相当すると考えられており、特開 2 0 0 0 - 1 3 9 4 6 5 のマーカーを起点に染色体

歩行を開始したのでは、R f - 1 遺伝子領域の絞込みに相当の時間を要したと考えられる。

#### V I . R f - 1 遺伝子の稔性回復機能の抑制方法

本発明において、稔性回復機能を有する核酸を含む、稔性回復遺伝子（R f - 1）座を含む核酸が単離され、その全塩基配列が決定されたことにより、R f - 1 遺伝子の稔性回復機能を遺伝子工学的に制御することが可能となった。よって、本発明は、さらに、R f - 1 遺伝子の稔性回復機能を抑制する方法を提供する。

本発明の R f - 1 遺伝子の稔性回復機能を抑制する方法は、例えば、配列番号 27 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基配列と少なくとも 70 % 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸、に対し相補的な塩基配列から選択される、連続した少なくとも 100 塩基の長さのアンチセンスを導入する、ことを含む。

本発明の R f - 1 遺伝子の稔性回復機能を抑制する方法は、一態様において、配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3、好ましくは、塩基 4 2 3 5 7 - 5 3 7 4 3、より好ましくは、塩基 4 2 1 3 2 - 4 8 8 8 3 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3、好ましくは、塩基 4 2 3 5 7 - 5 3 7 4 3、より好ましくは、塩基 4 2 1 3 2 - 4 8 8 8 3 の塩基配列と少なくとも 70 % 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸、に対し相補的な塩基配列から選択される、連続した少なくとも 100 塩基の長さのアンチセンスを導入することを含む。

アンチセンスは、少なくとも 100 塩基以上、より好ましくは 500 塩基以上、最も好ましくは 1000 塩基以上の長さである。導入の技術上の簡便性等の観点より、好ましくは 10000 塩基以下、より好ましくは 5000 塩基以下である。アンチセンスは、公知の方法により合成することが可能である。アンチセンスのイネへの導入は公知の方法により、例えば、T e r a d a e t a l . ( P l a n t C e l l P h y s i o l . 2 0 0 0 J u l , 4 1 ( 7 ) , p . 8 8 1 - 8 8 8 ) に記載の方法により行うことが可能である。

また、限定されるわけではないが、Tos17 (Hirochika H. et al. 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, p. 7783-7788) などの転移因子の挿入変異系統のなかから、配列番号27の塩基配列内に転移因子が挿入された系統を選抜することにより、Rf-1が破壊された系統を育成することも可能であると考えられる。さらに、植物においても相同組換えにより遺伝子破壊が研究されている。その系の確立により、配列番号27の塩基配列を有する核酸、または配列番号27の塩基配列と少なくとも70%同一である核酸を用いて、Rf-1遺伝子を変異型Rf-1遺伝子に置換することにより、稔性回復機能を抑制することも可能であると考えられる。

#### 参考文献

1. Fukuta et al. 1992, Jpn J. Breed. 42 (supl. 1) p. 164-165
2. 特開平7-222588
3. 特開平9-313187
4. 特開2000-139465
5. Harushima et al. 1998, Genetics 148 p. 479-494
6. Michaels and Amasino 1998, The Plant Journal 14 (3) p. 381-385
7. Neff et al. 1998, The plant Journal 14 (3) p. 387-392
8. D. E. Harry, et al., Theor Appl Genet (1998) 97: p. 327-336
9. Hiei et al., Plant Journal (1994), 6 (2), p. 272-282
10. Komari et al., Plant Journal (1996) 10, p. 165-174

11. Ditt a et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980), 77: p. 7347-7351
12. P. Vos, る、Nucleic Acids Res. Vol. 23, p. 4407-4414 (1995)
- 5 13. O. Parnaud, X. る, Mol. Gen. Genet. (1996) 252: p. 597-607
14. A. Konieczny る, (1993), Plant J. 4 (2) p. 403-410
15. Edwards る, Nucleic Acids Res. 8 (6): 1349, 1991
- 10 16. Murray M. G. る, Nucleic Acids Res. 8 (19): 4321-5, 1980
17. Terada et al., Plant Cell Physiol. 2000 Jul, 41 (7), p. 881-888
- 15 18. Hirochika H. et al. 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, p. 7783-7788

### 実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の技術的  
20 範囲を限定するためのものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に  
本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

### 参考例

以下の参考例は、本出願人の先の特許出願 特願2000-247204 (2  
25 000年8月17日出願) に記載された実施例に基づく。

#### 参考例1 Rf-1 遺伝子座周辺RFLPマーカ-のPCRマーカ-化

本参考例においては、Rf-1 遺伝子座周辺RFLPマーカ-9個 (R187  
7、G291、R2303、S12564、C1361、S10019、G40  
03、S10602、G2155) をPCRマーカ-化した。

### (1) 材料および方法

R f - 1 遺伝子座周辺 R F L P マーカ 9 個 ( R 1 8 7 7、G 2 9 1、R 2 3  
0 3、S 1 2 5 6 4、C 1 3 6 1、S 1 0 0 1 9、G 4 0 0 3、S 1 0 6 0 2、  
5 G 2 1 5 5 ) を農林水産省農業生物資源研究所から購入し、ベクター内の挿入塩  
基配列を決定した後、以下の手順で実験を行った。なお、本文中のイネ品種のう  
ち、あそみのりはジャポニカ米であり、I R 2 4 はインディカ米である。

### (2) ゲノミックライブラリーの作製

あそみのりの緑葉から、C T A B 法により各々トータルDNAを抽出した。M  
b o I で部分消化後、N a C l 密度勾配遠心 ( 6 ~ 2 0 % 直線勾配、2 0 ° C、3  
10 7 0 0 0 r p m、4 時間、全容量 1 2 m l ) によりサイズ分画を行った。各分画  
( 約 0 . 5 m l ) の一部を電気泳動にかけ、1 5 ~ 2 0 k b の DNA を含む分画  
を選抜・精製した。ライブラリーの作製は、L a m b d a D A S H I I  
( S t r a t a g e n e ) をベクターに用いて、付属プロトコールに準拠して行  
った。パッケージングには、G i g a P a c k I I I G o l d ( S t r  
15 a t a g e n e ) を用いた。パッケージング後、S M B u f f e r 5 0 0  
 $\mu$  l およびクロロフォルム 2 0  $\mu$  l を添加した。遠心後の上清にクロロフォルム  
2 0  $\mu$  l を添加し、ライブラリー溶液とした。

ライブラリー溶液の 5 0 倍希釈液 5  $\mu$  l を用いて、X L - 1 B l u e M  
R A ( P 2 ) に感染させた。その結果、あそみのりについては 8 3 個のプラーク  
20 が出現した。ライブラリーあたりでは、 $4.15 \times 10^5$  p f u となり、平均挿  
入断片長を 2 0 k b とすると、 $8.3 \times 10^9$  b p をカバーする計算になる。こ  
れは、イネゲノム ( $4 \times 10^8$  b p ) に対して十分な大きさのライブラリーであ  
ると考えられた。

### (3) R 1 8 7 7、C 1 3 6 1 および G 4 0 0 3 対応ゲノミッククロンの単 25 離

C 1 3 6 1 および G 4 0 0 3 については、R F L P マーカープローブを含むプ  
ラスミドを単離した後、制限酵素処理・電気泳動により、R F L P マーカープロー  
ブ部分を分離し、DNA 回収フィルター ( T a k a r a S U P R E C - 0  
1 ) を用いて目的の DNA を回収した。R 1 8 7 7 については、マーカープロー

ブ両端部に対してプライマーを設計し、あそみのりトータルDNAをテンプレートにPCRを行い、産物を電気泳動後、前述の方法で回収した。回収したDNAは、rediprime DNA labelling system (Amersham Pharmacia) を用いてラベルし、ライブラリースクリーニング用プローブとした。なお、PCRは常法により行った（以下、同様）。

ライブラリーのスクリーニングは、プラークをHybond-N+ (Amersham Pharmacia) にブロットした後、常法により行った。1stスクリーニング後、陽性プラーク周辺を打ち抜き、SMバッファーに懸濁し、2ndスクリーニングに供試した。2ndスクリーニング後、陽性プラークを打ち抜き、さらに3rdスクリーニングを行い、単一プラークを分離した。

分離した目的プラークをSMバッファーに懸濁後、プレートライセート法によりファージを一次増殖した。得られたファージ増殖液を用いて、振とう培養法により二次増殖を行った後、Lambda starter kit (QIAGEN) を用いてファージDNAを精製した。

各マーカーについて、8枚のプレートを用いて1stスクリーニングを行った。プレート1枚につきライブラリー溶液を10 $\mu$ l使用した。3rdスクリーニングまで行った結果、R1877、C1361およびG4003対応ゲノミッククローンを、それぞれ、4個、3個および3個単離した。

#### (4) R1877のPCRマーカー化

単離したゲノミッククローンを解析し、RFLPの原因部位、即ち、IR24 (インディカ米) には存在しあそみのり (ジャポニカ米) には存在しないEcoRI部位を同定することにより、PCRマーカー化を行った。

具体的には、単離した4クローンについて以下の解析を行った。まず、T3およびT7プライマーを用いて、各クローンの挿入断片の両末端の塩基配列を明らかにした。つぎに、マーカープローブ両端部に対して外向きのプライマーを設計し、T3およびT7プライマーと組合わせ（合計4プライマー組合せ）、各クローンをテンプレートにPCRを行った。

また、各クローンをNotIおよびEcoRIで消化した後、電気泳動することにより、挿入断片長および各EcoRI断片長を推定した。

これらの解析の結果、各クローンの位置関係を明らかにすることができた。一方、RFLP解析ではマーカープローブR1877により日本晴（ジャポニカ米）では20 kb、Kasalath（インディカ米）では6.4 kbのEcoRI断片が検出されること（ftp://ftp.staff.or.jp/pub/geneticmap98/parentsouthern/chr10/R1877.JPG）ことが知られている。これらの事実を併せ考えることにより、IR24には存在しあそみのりには存在しないEcoRI部位のおおよその位置が推定できた。そこで、その周辺を増幅するように設計したプライマー組合せ（配列番号1と配列番号2）を用いて、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて2分を1サイクルとし30サイクルのPCR条件にてゲノミックPCRを行った。得られたPCR産物をEcoRI処理した後、0.7%アガロースゲルで電気泳動した。

その結果、あそみのり－IR24間で期待通りの多型が観察された。すなわち、PCR産物（約3200 bp）のEcoRI処理により、IR24では1500 bpと1700 bpとに切断されるのに対し、あそみのりでは切断されなかった。あそみのり－IR24のRIL（Recombinant Inbred Line）を用いてこのPCRマーカーをマッピングした結果、RFLPマーカー座R1877と同一領域に位置づけられ、RFLPマーカーR1877がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーをR1877 EcoRIと命名した。

#### （5）G4003のPCRマーカー化

単離したゲノミッククローンを解析し、RFLPの原因部位、即ち、あそみのりには存在しIR24には存在しないHindIII部位を同定することにより、PCRマーカー化を行った。

R1877と同様の解析を行い、単離した3クローンの位置関係を明らかにした。RFLP解析ではマーカープローブG4003により日本晴（ジャポニカ米）では3 kb、Kasalathでは10 kb（インディカ米）のHindIII断片が検出されること（ftp://ftp.staff.or.jp/pub/geneticmap98/parentsouthern/chr10

／R1877. JPG) ことが知られている。これらの事実を併せ考えることにより、あそみのりには存在しIR24には存在しないHindIII部位が、2個の候補部位のいずれかであると推定された。そこで、各HindIII部位周辺を増幅するように設計したプライマー組合せ（配列番号3および配列番号4）を用いて、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクルの条件で、ゲノミックPCRを行った。得られたPCR産物をHindIII処理後、2%アガロースゲルで電気泳動したところ、マーカープローブ内部のHindIII部位が多型部位であることが示された。すなわち、PCR産物（362bp）のHindIII処理により、あそみのりでは95bpと267bpとに切断されるのに対し、IR24では切断されなかった。マッピングの結果、RFLPマーカーG4003がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーをG4003 HindIII（配列番号19）と命名した。

#### （6）C1361のPCRマーカー化

単離したゲノミッククローンの塩基配列情報に基づいてプライマーを設計した。あそみのりおよびIR24のトータルDNAをテンプレートにPCRを行い、産物を電気泳動後、既述の方法で回収した。回収したDNAをテンプレートに用いて、ABI Model 310により各品種の塩基配列を解読し、多型作出に利用可能な変異を探索した。

R1877と同様の解析を行い、単離した3クローンのおおよその位置関係を明らかにすることはできた。しかし、C1361マーカー周辺にはPCR増幅しにくい領域や塩基配列を解読できない領域が存在することが明らかになり、RFLP原因部位を同定することは困難であると考えられた。そこで、比較的長いPCR産物（2.7kb）が得られる領域に着目し、dCAPS化を試みることにした。

具体的には、あそみのり、コシヒカリ（以上、ジャポニカ米）及びKasalaath、IR24（以上、インディカ米）を用いて、前記領域のゲノミックPCR産物の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米・インディカ米間で多型を示す部位を6ヶ所見出すことができた。そのうちのひとつについて、dCAPS化を



行った。この過程で、プライマーとして配列番号5および配列番号6を用い、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をMwoI処理後、3%MetaPhor<sup>TM</sup>アガロースで電気泳動することにより解析した。

5 あそみのりでは2箇所切断され、約25bp、50bp、79bpのバンドが観察され、IR24では1箇所切断され、約50bp、107bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーC1361がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーをC1361 MwoI（配列番号20）と命名した。

10 (7) G2155のPCRマーカー化

マーカープローブ両端部に対してプライマーを設計し、あそみのり、コシヒカリ、IR24およびIL216（戻し交雑によりコシヒカリにRf-1遺伝子を導入した系統、遺伝子型はRf-1/Rf-1）のトータルDNAをテンプレートにPCRを行った。PCR産物の精製および多型作出に利用可能な変異の探索は、既述の方法で行った。

具体的には、供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、Rf-1遺伝子保有品種系統（IR24およびIL216）とRf-1遺伝子非保有品種系統

（あそみのりおよびコシヒカリ）との間の変異が3ヶ所見出された。そのうちのひとつを利用して、dCAPS化を行った。この過程で、プライマーとして配列

20 番号7及び配列番号8を用い、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をMwoI処理後、3%MetaPhor<sup>TM</sup>アガロースで電気泳動することにより解析した。あそみのりでは1箇所切断され、約25bp及び105bpのバンドが観察され、IR24では2箇所切断され、約25bp、27bp及び78bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーG2155がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーをG2155 MwoI（配列番号21）と命名した。

25 (8) G291のPCRマーカー化

マーカープローブ内部配列に対してプライマーを設計し、種々のプライマー組合わせでPCRを行い、期待される大きさの増幅産物が得られるプライマー組合わせを探索した。探索により見出したプライマー組合わせで、あそみのり、コシヒカリ、IR24およびIL216のトータルDNAをテンプレートにPCRを行った。PCR産物の精製および多型作出に利用可能な変異の探索は、既述の方法で行った。

具体的には、マーカープローブ配列に対して設計したプライマーを用いて、供試品種のゲノミックPCRを行い、産物の塩基配列を比較した。その結果、Rf-1遺伝子保有品種系統（IR24およびIL216）とRf-1遺伝子非保有品種系統（あそみのりおよびコシヒカリ）との間の変異が4ヶ所見出された。そのうちのひとつを利用して、dCAPS化を行った。この過程で、プライマーとして配列番号9及び配列番号10を用い、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をMspI処理後、3%MetaPhor<sup>TM</sup>アガロースで電気泳動することにより解析した。Rf-1遺伝子保有品種系統では2箇所切断され、約25bp、49bp及び55bpのバンドが観察され、Rf-1遺伝子非保有品種系統では1箇所切断され、約25bp及び104bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーG291がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーをG291 MspI（配列番号22）と命名した。

#### （9）R2303のPCRマーカー化

マーカープローブ内部配列に対してプライマーを設計し、あそみのり（ジャポニカ米）、IR24およびKasalath（インディカ米）のトータルDNAをテンプレートにPCRを行った。産物の精製および多型作出に利用可能な変異の探索は、既述の方法で行った。

供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米ーインディカ米間の変異が見出された。この変異は、BslI認識部位に生じていたので、そのままCAPSマーカーとした。この過程で、プライマーとして配列番号11及び配列番号12を用い、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて2分を1サ

イクルとし30サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をB s l I 処理後、2%アガロースで電気泳動することにより解析した。ジャポニカ米では1箇所切断され、約238bp及び1334bpのバンドが観察され、インディカ米では2箇所切断され、約238bp、655bp及び679bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカ―R2303がPCRマーカ―に変換されたことが証明され、このマーカ―をR2303 B s l I (配列番号23)と命名した。

(10) S10019のPCRマーカ―化

S10019のPCRマーカ―化は、上記R2303のPCRマーカ―化の方法(9)にしたがって行った。

具体的には、供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米ーインディカ米間の変異が見出された。この変異は、B s t U I 認識部位に生じていたので、そのままCAPSマーカ―とした。この過程で、プライマーとして配列番号13及び配列番号14を用い、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて1分を1サイクルとし30サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をB s t U I 処理後、2%アガロースで電気泳動することにより解析した。ジャポニカ米では1箇所切断され、約130bp及び462bpのバンドが観察され、インディカ米では2箇所切断され、約130bp、218bp及び244bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカ―S10019がPCRマーカ―に変換されたことが証明され、このマーカ―をB s t U I (配列番号24)と命名した。

(11) S10602のPCRマーカ―化

S10602のPCRマーカ―化は、上記R2303のPCRマーカ―化の方法(9)にしたがって行った。

具体的には、供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米ーインディカ米間の変異が見出された。その変異を利用して、CAPS化を行った。この過程で、プライマーとして配列番号15及び配列番号16を用い、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて1分を1サイクルとし33サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をK p n I 処理後、2%

アガロースで電気泳動することにより解析した。ジャポニカ米では1箇所切断され、約117bp及び607bpのバンドが観察され、インディカ米では切断されず、724bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーS10602がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを

5 S10602 KpnI (配列番号25) と命名した。

#### (12) S12564のPCRマーカー化

S12564のPCRマーカー化は、R2303のPCRマーカー化の方法にしたがって行った。

具体的には、供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米ー

10 インディカ米間の変異が見出された。その変異を利用して、dCAPS化を行った。この過程で、プライマーとして配列番号17及び配列番号18を用い、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をTsp509I処理後、3%MetaPhor<sup>TM</sup>アガロースで電気泳動することにより解析し

15 た。ジャポニカ米では2箇所切断され、26bp、41bp及び91bpのバンドが観察され、インディカ米では1箇所切断され、41bp及び117bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーS12564がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーをS12564 Tsp509I (配列番号26) と命名した。

#### 20 参考例2 Rf-1遺伝子座のマッピング

MSコシヒカリにMS-FRコシヒカリの花粉をかけて作成したF1集団1042個体の幼苗からDNAを抽出し、分析に供試した。ここで、MSコシヒカリとは、細胞質をBT型雄性不稔細胞質に置換したコシヒカリである(世代:BC10F1)。また、MS-FRコシヒカリとは、IR8(農業生物資源研究所より入手)に由来するRf-1遺伝子をMSコシヒカリに導入した系統である(Rf-1遺伝子座ヘテロ)。

25

まず、Rf-1遺伝子座を挟むと考えられる、参考例1に記載の2個のマーカー座R1877 EcoRIおよびG2155 MwoIにおける各個体の遺伝子型を調査した。R1877 EcoRI座またはG2155 MwoI座

に関してジャポニカ米型ホモ個体を、これら2マーカー座間での組換え体とみなした。つぎに、各組換え体について、さらに、G 2 9 1 M s p I 座、R 2 3 0 3 B s l I 座、S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座、C 1 3 6 1 M w o I 座、S 1 0 0 1 9 B s t U I 座、G 4 0 0 3 H i n d I I I 座および S 1 0 6 0 2 K p n I 座の遺伝子型を調査し、組換え位置を同定した。

R 1 8 7 7 E c o R I 座および G 2 1 5 5 M w o I 座に関する遺伝子型調査の結果、稔性を回復した46個体が R f - 1 遺伝子座付近での組換え体であることが明らかになった。これら組換え体について、R f - 1 遺伝子座近傍マーカー座の遺伝子型を調査した結果を表3に示す。

表3 Rf-1 座近傍組換え個体のマーカー座遺伝子型

Locus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
R1877 EcoRI	J	J	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
G291 MspI	H	H	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R2303 BslI	H	H	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
S12564 Tsp509I	H	H	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
C1361 MwoI	H	H	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
S10019 BstUI	H	H	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
G4003 HindIII	H	H	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
S10602 KpnI	H	H	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
G2155 MwoI	H	H	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H

J コシヒカリ型ホモ  
H コシヒカリ型/MS-FRコシヒカリ型ヘテロ

表3に示されたように、S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I マーカーがジャポニカ型である個体8と、C 1 3 6 1 M w o I 座マーカーがジャポニカ型である個体9および個体10が得られた。いずれも稔性を回復した個体であることから、前者はR f - 1 座とS 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座との間での組換え個体、R f - 1 座とC 1 3 6 1 M w o I 座との間での組換え個体と解し、R f - 1 遺伝子はS 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座とC 1 3 6 1 M w o I 座との間に存在することが判明した。上記交配において、B T 型雄性不稔細胞質を持つ個体では、R f - 1 遺伝子をもつ花粉のみが受精能力を持つとの報告（C. S h i n j y o , J A P A N . J . G E N E T I C S V o l . 4 4 , N o . 3 : 1 4 9 - 1 5 6 ( 1 9 6 9 ) ）に基づいて、R f - 1 遺伝子座を詳細連鎖地図上に位置づけることができた（図4）

#### 実施例1 R f - 1 座極近傍組換え個体の獲得

（材料および方法）

MS コシヒカリ（世代：B C 1 0 F 1）にMS - F R コシヒカリ（世代：B C 9 F 1、R f - 1 座ヘテロ）の花粉をかけて作成したB C 1 0 F 1 集団4 1 0 3 個体を用い、各固体からDNAを抽出し、上記参考例2と同様に、S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座およびC 1 3 6 1 M w o I 座の遺伝子型を調査した。S 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座の遺伝子型がコシヒカリ型ホモ個体を、R f - 1 座とS 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座との間での組換えにより生じた個体とみなし、C 1 3 6 1 M w o I 座の遺伝子型がコシヒカリ型ホモ個体を、R f - 1 座とC 1 3 6 1 M w o I 座との間での組換えにより生じた個体とみなした。

（結果および考察）

4 1 0 3 個体を調査した結果、R f - 1 座とS 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座との間での組換え個体を1 個体、R f - 1 座とC 1 3 6 1 M w o I 座との間での組換え個体を6 個体見出した。一方、上記参考例2において交配により得られた1 0 4 2 個体を調査した結果、表3に示したように、R f - 1 座とS 1 2 5 6 4 T s p 5 0 9 I 座との間での組換え個体を1 個体、R f - 1 座とC 1 3 6 1 M w o I 座との間での組換え個体を2 個体見出している。

合計すると、5145個体から、Rf-1座とS12564 Tsp509I座との間での組換え個体を2個体、Rf-1座とC1361 MwoI座との間での組換え個体を8個体獲得できたことになる。これら10個体を以下の実施例における高精度分離分析に供試することにした。

## 5 実施例2 染色体歩行

### (1) 1回目染色体歩行

#### (材料および方法)

ジャポニカ品種あそみのり (Rf-1非保有品種) のゲノムDNAを用いて、参考例1に記載したようにLambda DASH IIベクターによりゲノミ  
10 ャライブラリーを作成し、染色体歩行に供試した。

RFLPプローブ S12564の部分塩基配列 (アクセッション番号D47284) に対して次のプライマー対:

5' -atcaggagccttcaaattgggaac-3' (配列番号29) および

5' -ctcgcaaattgcttaattttgacc-3' (配列番号30)

15 を設計し、あそみのりトータルDNAをテンプレートに用いて、定法に従いPCRを行った。得られた約1200bpの増幅産物を、アガロースゲルでの電気泳動後、QIAEXII (QIAGEN社) を用いて精製した。精製したDNAは、rediprime DNA labelling system (Amersham Pharmacia社) を用いてラベルし、ライブラリースクリーニング用プローブ (プローブA、図1) とした。  
20

ライブラリーのスクリーニングは、ブランクをHybond-N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia社) にブロットした後、常法により行った。単一ブランクを分離した後、Lambda Midi kit (QIAGEN社) を用いてプレートライセート法によりファージDNAを精製した。

### 25 (結果および考察)

スクリーニングにより4個のクローンが得られ、末端塩基配列の解析および制限酵素断片長解析の結果から、そのうちのふたつ (WSA1およびWSA3) は図1に示した位置関係にあることが示された。プライマー歩行により、WSA1

およびW S A 3に対応するあそみのりゲノム塩基配列を決定した（DNAシーケンサー377、ABI社）。

（2）2回目染色体歩行

（材料および方法）

- 5 既述のあそみのりゲノミックライブラリーに加え、インディカ品種I R 2 4（R f - 1保有品種）のゲノムDNAから同様に作成したI R 2 4ゲノミックライブラリーを、染色体歩行に供試した。

（1）で明らかにしたあそみのりゲノム塩基配列に対して次のプライマー対：

- 5' - tgaaggagttatgggtgcgtgacg - 3' （配列番号31）および  
10 5' - ttgccgagcacacttgccatgtgc - 3' （配列番号32）

を設計し、W S A 3のDNAをテンプレートに用いて、定法に従いPCRを行った。得られた524bpの増幅産物を、既述の方法で精製・ラベルし、ライブラリースクリーニング用プローブ（プローブE、図1）とした。

- 15 ライブラリーのスクリーニングおよびファージDNAの精製は、既述の方法で行った。

（結果および考察）

- あそみのりゲノミックライブラリースクリーニングにより15個のクローンが得られ、末端塩基配列の解析および制限酵素断片長解析の結果から、そのうちのひとつ（W S E 8）は図1に示した位置関係にあることが示された。プライマー  
20 歩行により、W S E 8に対応するあそみのりゲノム塩基配列を決定した。

- I R 2 4ゲノミックライブラリースクリーニングにより7個のクローンが得られ、末端塩基配列の解析および制限酵素断片長解析の結果から、そのうちのふたつ（X S E 1およびX S E 7）は図1に示した位置関係にあることが示された。プライマー歩行により、X S E 1およびX S E 7に対応するI R 2 4ゲノム塩基  
25 配列を決定した。

（3）3回目染色体歩行

（材料および方法）

既述のあそみのりゲノミックライブラリーおよびI R 2 4ゲノミックライブラリーを、染色体歩行に供試した。



(2) で明らかにしたあそみのりゲノム塩基配列に対して次のプライマー対：

5' -gcgacgcaatggacatagtgctcc-3' (配列番号33) および

5' -ttacctgccaagcaatatccatcg-3' (配列番号34)

を設計し、WSE8のDNAをテンプレートに用いて、定法に従いPCRを行った。得られた1159bpの増幅産物を、既述の方法で精製・ラベルし、ライブラリスクリーニング用プローブ（プローブF、図1）とした。

ライブラリーのスクリーニングおよびファージDNAの精製は、既述の方法で行った。

(結果および考察)

10 あそみのりゲノミックライブラリスクリーニングにより8個のクローンが得られ、末端塩基配列の解析および制限酵素断片長解析の結果から、そのうちのふたつ（WSF5およびWSF7）は図1に示した位置関係にあることが示された。プライマー歩行により、WSF5およびWSF7に対応するあそみのりゲノム塩基配列を決定した。

15 IR24ゲノミックライブラリスクリーニングにより13個のクローンが得られ、末端塩基配列の解析および制限酵素断片長解析の結果から、そのうちのふたつ（XSF4およびXSF20）は図1に示した位置関係にあることが示された。プライマー歩行により、XSF4およびXSF20に対応するIR24ゲノム塩基配列を決定した。

20 (4) 4回目染色体歩行

(材料および方法)

既述のあそみのりゲノミックライブラリーおよびIR24ゲノミックライブラリーを、染色体歩行に供試した。

(3) で明らかにしたあそみのりゲノム塩基配列に対してプライマー対：

25 5' -aaggcatactcagtgagggaag-3' (配列番号35) および

5' -ttaacctgaccgcaagcacctgtc-3' (配列番号36)

を設計し、WSF7のDNAをテンプレートに用いて、定法に従いPCRを行った。得られた456bpの増幅産物を、既述の方法で精製・ラベルし、ライブラリスクリーニング用プローブ（プローブG、図1）とした。

ライブラリーのスクリーニングおよびファージDNAの精製は、既述の方法で行った。

(結果および考察)

あそみのりゲノミックライブラリースクリーニングにより6個のクローンが得られ、末端塩基配列の解析および制限酵素断片長解析の結果から、そのうちのふたつ(WSG2およびWSG6)は図1に示した位置関係にあることが示された。プライマー歩行により、WSG2およびWSG6に対応するあそみのりゲノム塩基配列を決定した。

IR24ゲノミックライブラリースクリーニングにより14個のクローンが得られ、末端塩基配列の解析および制限酵素断片長解析の結果から、そのうちの3クローン(XSG8、XSG16およびXSG22)は図1に示した位置関係にあることが示された。プライマー歩行により、XSG8、XSG16およびXSG22に対応するIR24ゲノム塩基配列を決定した。

(5) 5回目染色体歩行

(材料および方法)

既述のIR24ゲノミックライブラリーを、染色体歩行に供試した。

本発明者らは、TIGR(The Institute for Genomic Research)の公開ホームページを閲覧し、RFLPマーカーS12564を包含するBAC(Bacterial Artificial Chromosome)クローン(アクセッション番号AC068923)が公開データベース(GenBank)に登録されていることを見出した。このBACクローンは、ジャポニカ品種日本晴のゲノムDNAを含むものであり、塩基配列を比較したところ、(1) - (4)で作成したあそみのりおよびIR24のコンテ

25      そこで、このBACクローンの一部を増幅する次のプライマー対：

5' -tggtatggactatgtgggggtcagtc- 3'      (配列番号37) および

5' -agtggaagtggagagagtagggag- 3'      (配列番号38)

を設計し、I R 2 4 トータルDNAをテンプレートに用いて、定法に従いP C R  
を行った。得られた約6 0 0 b pの増幅産物を、既述の方法で精製・ラベルし、  
ライブラリースクリーニング用プローブ（プローブH、図1）とした。

ライブラリーのスクリーニングおよびファージDNAの精製は、既述の方法で  
5 行った。

（結果および考察）

I R 2 4 ゲノミックライブラリースクリーニングにより1 5 個のクローンが得  
られ、末端塩基配列の解析および制限酵素断片長解析の結果から、そのうちのひ  
とつ（X S H 1 8）は図1に示した位置関係にあることが示された。プライマー  
10 歩行により、X S H 1 8に対応するI R 2 4 ゲノム塩基配列を決定した。

### 実施例3 高精度分離分析

（1）P C RマーカーP 4 4 9 7 M b o I の開発

実施例2で明らかにしたI R 2 4 コンティグに対応するゲノム塩基配列（配列  
15 番号2 7）とあそみのりコンティグに対応するゲノム塩基配列（配列番号2 8）  
とを比較した結果、配列番号2 7の1 2 3 9番目の塩基がAであるのに対し、当  
該位置に対応する配列番号2 8の1 2 6 3 1番目の塩基はGであることを見出し  
た。

この差異の検出には、先ず次のプライマー対：

20 P 4 4 9 7 M b o I F：

5' - ccctccaacacataaatggttgag - 3' （配列番号3 9）

（配列番号2 7の塩基8 5 3 - 8 7 6に相当）

（配列番号2 8の塩基1 2 2 4 7 - 1 2 2 7 0に相当）

および

25 P 4 4 9 7 M b o I R：

5' - tttctgccaggaaactgttagatg - 3' （配列番号4 0）

（配列番号2 7の塩基1 5 8 3 - 1 5 6 0に相当）

（配列番号2 8の塩基1 2 9 7 5 - 1 2 9 5 2に相当）

を用いて当該部位周辺のPCR増幅を行い約730bpの断片を増幅する。増幅産物をMboI処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、IR24DNAからの増幅産物はMboIの認識配列（GATC）をもたず、MboI処理により切断されないのに対し、あそみのりDNAからの増幅産物はMboIの認識配列をもち、MboI処理により切断されるため、MboI処理後のDNA鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

## (2) PCRマーカーP9493 BslIの開発

実施例2で明らかにしたIR24コンティグに対応するゲノム塩基配列（配列番号27）とあそみのりコンティグに対応するゲノム塩基配列（配列番号28）とを比較した結果、配列番号27の6227番目の塩基がAであるのに対し、当該位置に対応する配列番号28の17627番目の塩基はCであることを見出した。

この差異の検出には、先ず次のプライマー対：

P9493 BslI F：

5' -gcgatccttatacgcatatgcg-3' （配列番号41）

（配列番号27の塩基6129-6152に相当）

（配列番号28の塩基17529-17552に相当）

および

P9493 BslI R：

5' -aaagtctttgttccttcaccaagg-3' （配列番号42）

（配列番号27の塩基6254-6231に相当）

（配列番号28の塩基17654-17631に相当）

を用いて当該部位周辺のPCR増幅を行い126bpの断片を増幅する。増幅産物をBslI処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、IR24DNAからの増幅産物はBslIの認識配列（CCNNNNNNNGG）をもたず、BslI処理により切断されないのに対し、あそみのりDNAからの増幅産物はBslIの認識配列をもち、BslI処

理により切断されるため、B s l I 処理後のDNA鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

なお、本マーカーの開発には、dCAPS法 (M i c h a e l s a n d A m a s i n o 1998, N e f f e t a l 1998) を適用した。具体的には、前記P 9 4 9 3 B s l I Rプライマーの使用により、配列番号27の6 2 3 6および配列番号28の1 7 6 3 6のaがgに置換される。これにより、あそみのりDNA由来の断片は、配列番号28の1 7 6 2 6 - 1 7 6 3 6の部分の配列がC C t t t c c t t G Gとなり、B s l I 処理により切断される。

### (3) P C RマーカーP 2 3 9 4 5 M b o Iの開発

実施例2で明らかにしたI R 2 4コンティグに対応するゲノム塩基配列 (配列番号27) とあそみのりコンティグに対応するゲノム塩基配列 (配列番号28) とを比較した結果、配列番号27の2 0 6 8 0番目の塩基がGであるのに対し、当該位置に対応する配列番号28の3 2 0 7 9番目の塩基はAであることを見出した。

この差異の検出には、先ず次のプライマー対：

P 2 3 9 4 5 M b o I F：

5' -gaggatttatcaaaacaggatggacg-3' (配列番号43)

(配列番号27の塩基2 0 5 1 9 - 2 0 5 4 4に相当)

(配列番号28の塩基3 1 9 1 8 - 3 1 9 4 3に相当)

および

P 2 3 9 4 5 M b o I R：

5' -tgggcggcagcagtgaggataga-3' (配列番号44)

(配列番号27の塩基2 0 7 7 8 - 2 0 7 5 5に相当)

(配列番号28の塩基3 2 1 7 7 - 3 2 1 5 4に相当)

を用いて当該部位周辺のP C R増幅を行い2 6 0 b pの断片を増幅する。増幅産物をM b o I 処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、I R 2 4 DNAからの増幅産物はM b o I の認識配列 (G A T C) をもち、M b o I 処理により切断されるのに対し、あそみのりDNAからの増幅産物はM b o I の認識配列をもたず、M b o I 処理により切断され

ないため、M b o I 処理後のDNA鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

(4) P C R マーカ P 4 1 0 3 0 T a q I の開発

実施例 2 で明らかにした I R 2 4 コンティグに対応するゲノム塩基配列 (配列番号 2 7) とあそみのりコンティグに対応するゲノム塩基配列 (配列番号 2 8) とを比較した結果、配列番号 2 7 の 4 5 4 6 1 番目の塩基が A であるのに対し、当該位置に対応する配列番号 2 8 の 4 9 1 6 4 番目の塩基は G であることを見出した。

この差異の検出には、先ず次のプライマー対：

10 P 4 1 0 3 0 T a q I F :

5' - aagaaggagggttatagaatctg - 3' (配列番号 4 5)

(配列番号 2 7 の塩基 4 5 3 6 9 - 4 5 3 9 2 に相当)

(配列番号 2 8 の塩基 4 9 0 7 2 - 4 9 0 9 5 に相当)

および

15 P 4 1 0 3 0 T a q I R :

5' - atatcaggactaacaccactgctc - 3' (配列番号 4 6)

(配列番号 2 7 の塩基 4 5 6 4 8 - 4 5 6 2 5 に相当)

(配列番号 2 8 の塩基 4 9 3 5 1 - 4 9 3 2 8 に相当)

を用いて当該部位周辺の P C R 増幅を行い 2 8 0 b p の断片を増幅する。増幅産物を T a q I 処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、I R 2 4 DNA からの増幅産物は T a q I の認識配列 (T C G A) をもたず、T a q I 処理により切断されないのに対し、あそみのり DNA からの増幅産物は T a q I の認識配列をもち、T a q I 処理により切断されるため、T a q I 処理後の DNA 鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

(5) P C R マーカ P 4 5 1 7 7 B s t U I の開発

実施例 2 で明らかにした I R 2 4 コンティグに対応するゲノム塩基配列 (配列番号 2 7) とあそみのりコンティグに対応するゲノム塩基配列 (配列番号 2 8) とを比較した結果、配列番号 2 7 の 4 9 6 0 9 番目の塩基が A であるのに対し、

当該位置に対応する配列番号 28 の 53311 番目の塩基は G であることを見出した。

この差異の検出には、先ず次のプライマー対：

P 4 5 1 7 7 B s t U I F：

5 5' - acgagtagtagcgatccttcagcg - 3' (配列番号 47)

(配列番号 27 の塩基 49355 - 49378 に相当)

(配列番号 28 の塩基 53057 - 53080 に相当)

および

P 4 5 1 7 7 B s t U I R：

10 5' - cagcgtgaaactaaaaacggaggc - 3' (配列番号 48)

(配列番号 27 の塩基 50166 - 50143 に相当)

(配列番号 28 の塩基 53868 - 53845 に相当)

を用いて当該部位周辺の PCR 増幅を行い 812 bp の断片を増幅する。増幅産物を B s t U I 処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、I R 2 4 DNA からの増幅産物は B s t U I の認識配列 (C G C G) を 2 箇所もち、B s t U I 処理により 3 個の断片に切断されるの  
15 に対し、あそみのり DNA からの増幅産物は B s t U I の認識配列を 3 箇所もち、B s t U I 処理により 4 個の断片に切断されるため、B s t U I 処理後の DNA 鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができ  
20 る。

(6) PCR マーカー B 6 0 3 0 4 M s p I の開発

実施例 2 で明らかにした I R 2 4 コンティグに対応するゲノム塩基配列 (配列番号 27) と既述の B A C クローン (アクセッション番号 A C 0 6 8 9 2 3) の塩基配列とを比較した結果、配列番号 27 の 56368 番目の塩基が T であるの  
25 に対し、当該位置に対応する A C 0 6 8 9 2 3 の塩基は C であることを見出した。

この差異の検出は、先ず次のプライマー対：

B 6 0 3 0 4 M s p I F：

5' - atccacatcatcataatccgacc - 3' (配列番号 49)

(配列番号 27 の塩基 5 6 1 4 9 – 5 6 1 7 2 に相当)

および

B 6 0 3 0 4 M s p I R :

5' – agcttctcccttgatacgggtggcg – 3' (配列番号 50)

5 (配列番号 27 の塩基 5 6 4 7 9 – 5 6 4 5 5 に相当)

を用いて当該部位周辺の P C R 増幅を行い約 3 3 0 b p の断片を増幅する。増幅産物を M s p I 処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、I R 2 4 D N A からの増幅産物は M s p I の認識配列 (C C G G) をもたず、M s p I 処理により切断されないのに対し、日本晴 D N A からの増幅産物は M s p I の認識配列をもち、M s p I 処理により切断されるため、M s p I 処理後の D N A 鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

なお、本マーカーの開発には、d C A P S 法を適用した。具体的には、B 6 0 3 0 4 M s p I R プライマーの使用により、配列番号 27 の 5 6 4 6 3 の g が t に置換される。これにより、配列番号 27 の 5 6 4 6 0 – 5 6 4 6 3 の M s p I の認識配列 C C G G が c c g t となり、M s p I によって切断されなくなる。よって、I R 2 4 由来の断片は M s p I の認識配列を一つも有さず、一方、日本晴由来の D N A は、配列番号 27 の 5 6 3 6 7 – 5 6 3 7 0 に対応する領域に 1 箇所 M s p I の認識配列を有することとなる。

20 (7) P C R マーカー B 5 9 0 6 6 B s a J I の開発

実施例 2 で明らかにした I R 2 4 コンティグに対応するゲノム塩基配列 (配列番号 27) と既述の B A C クローン (アクセッション番号 A C 0 6 8 9 2 3) の塩基配列とを比較した結果、配列番号 27 の 5 7 6 2 9 番目の塩基が C であるのに対し、当該位置に対応する A C 0 6 8 9 2 3 の塩基は C C であることを見出した。

この差異の検出は、先ず次のプライマー対:

B 5 9 0 6 6 B s a J I F :

5' – atttggttggttagttgcggctgag – 3' (配列番号 51)

(配列番号 27 の塩基 5 7 5 6 3 – 5 7 5 8 6 に相当)



および

B 5 9 0 6 6    B s a J I    R :

5' - g c c c a a a c t c a a a a g g a g a g a a c c - 3'    (配列番号 5 2)

(配列番号 2 7 の塩基 5 7 9 8 3 - 5 7 9 6 0 に相当)

- 5    を用いて当該部位周辺の P C R 増幅を行い約 4 2 0 b p の断片を増幅する。増幅産物を B s a J I 処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、I R 2 4 DNA からの増幅産物は B s a J I の認識配列 (C C N N G G) をもたず、B s a J I 処理により切断されないのに対し、日本晴 DNA からの増幅産物は B s a J I の認識配列をもち、B s a J I 処理により切断されるため、B s a J I 処理後の DNA 鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

(8) P C R マーカー B 5 6 6 9 1    X b a I の開発

- 実施例 2 で明らかにした I R 2 4 コンティグに対応するゲノム塩基配列 (配列番号 2 7) と既述の B A C クローン (アクセッション番号 A C 0 6 8 9 2 3) の塩基配列とを比較した結果、配列番号 2 7 の 6 6 2 6 7 番目の塩基が G であるのに対し、当該位置に対応する A C 0 6 8 9 2 3 の塩基は C であることを見出した。

この差異の検出は、先ず次のプライマー対 :

B 5 6 6 9 1    X b a I    F :

- 20    5' - c c t c a a g t c t c c c c t a a a g c c a c t - 3'    (配列番号 5 3)

(配列番号 2 7 の塩基 6 6 1 2 9 - 6 6 1 5 2 に相当)

および

B 5 6 6 9 1    X b a I    R :

5' - g c t c t a c t g c t g a t a a a c c g t g a g - 3'    (配列番号 5 4)

- 25    (配列番号 2 7 の塩基 6 6 7 9 9 - 6 6 7 7 6 に相当)

を用いて当該部位周辺の P C R 増幅を行い約 6 7 0 b p の断片を増幅する。増幅産物を X b a I 処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、I R 2 4 DNA からの増幅産物は X b a I の認識配列 (T C T A G A) をもたず、X b a I 処理により切断されないのに対し、日本晴

DNAからの増幅産物はXbaIの認識配列をもち、XbaI処理により切断されるため、XbaI処理後のDNA鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

(9) PCRマーカーB53627 BstZ17Iの開発

- 5 実施例2で明らかにしたIR24コンティグに対応するゲノム塩基配列（配列番号27）と既述のBACクローン（アクセッション番号AC068923）の塩基配列とを比較した結果、配列番号27の69331番目の塩基がTであるのに対し、当該位置に対応するAC068923の塩基はCであることを見出した。

- 10 この差異の検出は、先ず次のプライマー対：

B53627 BstZ17I F：

5' -tggaatggactatgtggggtcagtc-3' （配列番号55）

（配列番号27の塩基68965-68988に相当）

および

- 15 B53627 BstZ17I R：

5' -agtgggaagtggagagagtagggag-3' （配列番号56）

（配列番号27の塩基69582-69559に相当）

を用いて当該部位周辺のPCR増幅を行い約620bpの断片を増幅する。

増幅産物をBstZ17I処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、

- 20 可視化することができる。すなわち、IR24DNAからの増幅産物はBstZ17Iの認識配列（GTATAC）をもち、XbaI処理により切断されるのに対し、日本晴DNAからの増幅産物はBstZ17Iの認識配列をもたず、BstZ17I処理により切断されないため、BstZ17I処理後のDNA鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

- 25 (10) PCRマーカーB40936 MseIの開発

以下の(10)-(12)のPCRマーカーの開発はいずれも、配列番号27の3'末端76363よりもさらに下流(3'末端)側に相当する塩基配列についての研究に関する。

既述のBACクローン（アクセッション番号AC068923）の塩基配列に対して、次のプライマー対：

5' - tacgacgccatttcactccattgc - 3' （配列番号57）

および

5 5' - cattttctctatgggcgttgctctg - 3' （配列番号58）

を設計した。このプライマー対を用いて、MS-FRコシヒカリ（Rf-1座の遺伝子型はRf-1 Rf-1）およびコシヒカリのトータルDNAをテンプレートに、定法に従いPCRを行った。得られた約1300bpの増幅産物を、アガロースゲルでの電気泳動後、QIAEXII（QIAGEN社）を用いて精製した。精製したDNAの塩基配列を、DNAシーケンサー377（ABI社）により解析した結果、数箇所において多型を見出すことができた。

そのひとつは、次のプライマー対：

B40936 MseI F：

5' - acctgtaggtatggcaccttcaacac - 3' （配列番号59）

15 および

B40936 MseI R：

5' - ccaaggaacgaagttcaaattgtatgg - 3' （配列番号60）

を用いて当該部位周辺のPCR増幅を行い、増幅産物をMseI処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、MS-FRコシヒカリ（Rf-1 Rf-1）DNAからの増幅産物はMseIの認識配列（TTAA）をもち、MseI処理により切断されるのに対し、コシヒカリDNAからの増幅産物はMseIの認識配列をもたず、MseI処理により切断されないため、MseI処理後のDNA鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

25 なお、本マーカーの開発には、dCAPS法を適用した。

（11）PCRマーカーB19839 MwoIの開発

既述のBACクローン（アクセッション番号AC068923）の塩基配列に対して、次のプライマー対：

5' - tgatgtgtttgggcatccctttcg - 3' （配列番号61）

および

5' -gagataggggacgacagacacgac- 3' (配列番号 6 2)

を設計した。このプライマー対を用いて、MS-FR コシヒカリ (Rf-1 Rf-1) およびコシヒカリのトータルDNAをテンプレートに、定法に従いPCRを行なった。得られた約1200bpの増幅産物を、アガロースゲルでの電気泳動後、QIAEXII (QIAGEN社) を用いて精製した。精製したDNAの塩基配列を、DNAシーケンサー377 (ABI社) により解析した結果、数箇所において多型を見出すことができた。

そのひとつは、次のプライマー対：

10 B19839 MwoI F：

5' -tcctatggctgttttagaaactgcaca- 3' (配列番号 6 3)

および

B19839 MwoI R：

5' -caagttcaaacataactggcgttg- 3' (配列番号 6 4)

15 を用いて当該部位周辺のPCR増幅を行い、増幅産物をMwoI処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、MS-FR コシヒカリ (Rf-1 Rf-1) DNAからの増幅産物はMwoIの認識配列 (GCNNNNNNNGC) をもたず、MwoI処理により切断されないのに対し、コシヒカリDNAからの増幅産物はMwoIの認識配列をもち、MwoI処理により切断されるため、MwoI処理後のDNA鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

なお、本マーカーの開発には、dCAPS法を適用した。

(12) PCRマーカーB2387 BfaI の開発

既述のBACクローン (アクセッション番号AC068923) の塩基配列に

25 対して、次のプライマー対：

5' -cactgtcctgtaagtgtgctgtgc- 3' (配列番号 6 5)

および

5' -caagcgtgtgataaaatgtgacgc- 3' (配列番号 6 6)

を設計した。このプライマー対を用いて、MS-FR コシヒカリ (Rf-1 Rf-1) およびコシヒカリのトータルDNAをテンプレートに、定法に従いPCRを行った。得られた約1300bpの増幅産物を、アガロースゲルでの電気泳動後、QIAEXII (QIAGEN社) を用いて精製した。精製したDNAの塩基配列を、DNAシーケンサー377 (ABI社) により解析した結果、数個所において多型を見出すことができた。

そのひとつは、次のプライマー対：

B2387 BfaI F：

5' -tgctacttgccattactatgtgac-3' (配列番号67)

および

B2387 BfaI R：

5' -acatactaccgtaaattggtctctg-3' (配列番号68)

を用いて当該部位周辺のPCR増幅を行い、増幅産物をBfaI処理後、アガロースゲルで電気泳動することにより、可視化することができる。すなわち、MS-FR コシヒカリ (Rf-1 Rf-1) DNAからの増幅産物はBfaIの認識配列 (CTAG) をもたず、BfaI処理により切断されないのに対し、コシヒカリDNAからの増幅産物はBfaIの認識配列をもち、BfaI処理により切断されるため、BfaI処理後のDNA鎖長が異なり、アガロースゲル中の移動度の差異として検出することができる。

### (13) 分離分析

実施例1で得られた、Rf-1座とS12564 Tsp509I座との間での組換え個体2個体 (RS1およびRS2) およびRf-1座とC1361 MwoI座との間での組換え個体8個体 (RC1からRC8) について、上記

(1) ないし (12) で開発した12個のDNAマーカー座の遺伝子型を調査した。結果を、各個体のS12564 Tsp509I座およびC1361 MwoI座の遺伝子型とともに表4に示した。

表 4 *Rf-1* 座極近傍組換え個体のマーカー座遺伝子型

Locus	RS1	RS2	RC1	RC2	RC3	RC4	RC5	RC6	RC7	RC8
S12564 Tsp509I	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H
P4497 MboI	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H
P9493 BslI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
P23945 MboI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
P41030 TaqI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
P45177 BstUI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
B60304 MspI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
B59066 BsaJI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
B56691 XbaI	H	H	H	H	H	H	H	J	H	H
B53627 BstZ17I	H	H	H	H	H	H	H	J	H	H
B40936 MseI	H	H	H	H	H	H	H	J	H	H
B19839 MwoI	H	H	H	H	H	J	H	J	H	H
B2387 BfaI	H	H	H	H	H	J	H	J	H	J
C1361 MwoI	H	H	J	J	J	J	J	J	J	J

J コシヒカリ型ホモ  
H コシヒカリ型/MS-FRコシヒカリ型ヘテロ

表 4 は、いずれの個体も P 9 4 9 3 B s l I ないし 5 9 0 6 6 B s a J I の間については、インディカ型品種由来の *Rf-1* 染色体領域を有することを示す。この結果から、図 3 で示したような染色体構成をもつ組換え型花粉において、花粉の受精能力があること、すなわち、*Rf-1* 遺伝子が機能していることが示された。これは、これらの組換え型花粉が共有するインディカ型領域、すなわち、最大限に見積もっても P 4 4 9 7 M b o I 座から B 5 6 6 9 1 X b a I 座までの領域（約 6 5 k b）に、*Rf-1* 遺伝子の機能の有無を決定する配列が含まれることを意味する。

ただし、*Rf-1* 遺伝子の一部の遺伝子型がインディカ型であることが、*Rf-1* 遺伝子の遺伝子機能発現に重要であり、残りの部分はジャポニカ型でもインディカ型でも遺伝子機能に大きな差異を生じない可能性がある。よって、上記共有インディカ型領域（配列番号 27 の塩基 1 2 3 9 ないし 6 6 2 6 7）が *Rf-1* 遺伝子全体を完全に包含するとは、断定できない。しかしながら、以下の理由、

- 1) 遺伝子の大きさは通常数 k b であり 1 0 k b を超えることは稀である；
- 2) 本発明で明らかにした I R 2 4 のゲノム塩基配列（配列番号 27）は、上記共有インディカ型領域を完全に包含する；
- 3) 配列番号 27 の 5' 末端は、上記共有インディカ型領域の 5' 末端から 1 2 3 8 b p 上流に位置し、別の遺伝子（S 1 2 5 6 4）の一部である；および

4) 配列番号27の3'末端は、上記共有インディカ型領域の3'末端から10096bp下流に位置する  
により、少なくとも配列番号27はRf-1遺伝子全体を完全に包含すると考えられる。

5 実施例4 XSE1由来の9.7kb断片に関する相補性試験

(材料および方法)

10 λファージクローンXSE1 (図1および5) をNotIで完全消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された9.7kbの断片 (配列番号27の塩基1-9657を含む) を、QIAEXII (QIAGEN社) を用いて精製した。

一方、pSB11 (Komariら、上述) を基に、ハイグロマイシン耐性遺伝子カセットを持つ中間ベクターpSB200を作成した。具体的には、まず、ユビキチンプロモーターとユビキチンイントロン (Pubi-ubiI) に、ノパリン合成酵素のターミネーター (Tnos) を接続した。これより得られたPubi-ubiI-Tnos接続体のubiI-Tnos間に、ハイグロマイシン体制遺伝子 (HYG (R)) を挿入することにより、Pubi-ubiI-HYG (R)-Tnosからなる接続体を得た。この接続体を、pSB11のHindIII/EcoRI断片に接続することにより、pKY205を得た。このpKY205のPubi上流に存在するHindIII部位にNotI、NspV、EcoRV、KpnI、SacI、EcoRIの制限酵素部位を追加するためのリンカー部位を挿入することにより、ハイグロマイシン耐性遺伝子カセットを有するpSB200を得た。

25 上記プラスミドベクターpSB200をNotIで完全消化後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAをTE溶液に溶解後、CIAP (TAKARA社) により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII (QIAGEN社) を用いてゲルからベクター断片を精製した。

上記により準備した、XSE1由来の9.7kb断片とベクター断片の二つの断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1 (TAKA

RA社)を用いてライゲーション反応を行った。反応後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAを純水(Millipore社製装置により作成)に溶解後、大腸菌DH5 $\alpha$ と混合し、エレクトロポレーションに供試した。エレクトロポレーション後の溶液を、LB培地で振盪培養(37°C、1時間)した後、スペクチノマイシンを含むLBプレートに広げ、加温(37°C、16時間)した。生じたコロニーのなかの24個についてプラスミドを単離した。その制限酵素断片長パターンおよび境界部塩基配列を調査することにより、組換えプラスミドにより形質転換された所望の大腸菌を選抜した。

上記により選抜した大腸菌を、*Agrobacterium tumefaciens* 菌株 LBA4404/pSB1 (Komari et al, 1996) およびヘルパー大腸菌 HB101/pRK2013 (Ditta et al, 1980) とともに供試して、Ditta et al (1980) の方法に従い、三菌系交雑 (triparential mating) を行った。スペクチノマイシンを含むABプレートに生じたコロニーのなかの6個について、プラスミドを単離し、制限酵素断片長パターンを調査することにより、所望のアグロバクテリウムを選抜した。

上記により選抜したアグロバクテリウムを用いて、Hiei et al (1994) の方法に準拠し、MSコシヒカリ(BT細胞質を持ち、核遺伝子はコシヒカリとほぼ同一)の形質転換を行った。形質転換に必要なMSコシヒカリの未熟種子は、MSコシヒカリにコシヒカリの花粉をかけることにより作成した。

形質転換植物は、馴化後、長日条件の温室に移した。移植適期まで育成した後、48個体の植物を、1/5000アールのワグネルポットに移植し(4個体/ポット)、移植3~4週間後に短日条件の温室に移した。出穂約1か月後に、種子稔性を立毛調査した。

(結果および考察)

形質転換植物48個体は、いずれも不稔であった。このことから、導入した9.7kb断片は、少なくとも完全長のRf-1遺伝子を包含していないと考えられた。



### 実施例 5 XSE 7 由来の 14.7 kb 断片に関する相補性試験

(材料および方法)

λファージクローンXSE 7 (図1および5) をEcoRIで完全消化後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAをTE溶液に溶解後、DNA Blunting Kit (TAKARA社) により平滑化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけ、分離された14.7 kbの断片 (配列番号27の塩基2618-17261を含む) を、QIAEXII (QIAGEN社) を用いて精製した。

一方、プラスミドベクターpSB200をSacIで完全消化後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAをTE溶液に溶解後、CIAP (TAKARA社) により脱リン酸化し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAをTE溶液に溶解後、DNA Blunting Kit (TAKARA社) により平滑化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII (QIAGEN社) を用いてゲルからベクター断片を精製した。

上記により準備した、XSE 7 由来の14.7 kb断片とベクター断片の二つの断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1 (TAKARA社) を用いてライゲーション反応を行った。以後、実施例4に記載の方法に準拠して、形質転換植物を作成・調査した。

(結果および考察)

形質転換植物48個体は、いずれも不稔であった。このことから、導入した14.7 kb断片は、少なくとも完全長のRf-1遺伝子を包含していないと考えられた。

### 実施例 6 XSF 4 由来の 21.3 kb 断片に関する相補性試験

(材料および方法)

λファージクローンXSF 4 (図1および5) をNotIで部分消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された21.3 kbの断片 (配列番号27の塩基12478-33750を含む) を、QIAEXII (QIAGEN社) を用いて精製した。

一方、プラスミドベクター pSB200 を Not I で完全消化後、エタノール沈殿により DNA を回収した。回収した DNA を TE 溶液に溶解後、CIAP (TAKARA 社) により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII (QIAGEN 社) を用いてゲルからベクター断片を精製した。

上記により準備した、XSF4 由来の 21.3 kb の断片とベクター断片の二つの断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1 (TAKARA 社) を用いてライゲーション反応を行った。以後、実施例 4 に記載の方法に準拠して、形質転換植物を作成・調査した。

(結果および考察)

形質転換植物 48 個体は、いずれも不稔であった。このことから、導入した 21.3 kb 断片は、少なくとも完全長の Rf-1 遺伝子を包含していないと考えられた。

#### 実施例 7 XSF20 由来の 13.2 kb 断片に関する相補性試験

(材料および方法)

λファージクローン XSF20 (図 1 及び 5) を Sal I で完全消化後、エタノール沈殿により DNA を回収した。回収した DNA を TE 溶液に溶解後、DNA Blunting Kit (TAKARA 社) により平滑化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけ、分離された 13.2 kb の断片 (配列番号 2 の塩基 26809-40055 を含む) を、QIAEXII (QIAGEN 社) を用いて精製した。

一方、プラスミドベクター pSB200 を EcoRV で完全消化後、エタノール沈殿により DNA を回収した。回収した DNA を TE 溶液に溶解後、CIAP (TAKARA 社) により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII (QIAGEN 社) を用いてゲルからベクター断片を精製した。

上記により準備した、XSF20 由来の 13.2 kb の断片とベクター断片の二つの断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1 (T

AKARA社)を用いてライゲーション反応を行った。以後、実施例4に記載の方法に準拠して、形質転換植物を作成・調査した。

(結果および考察)

形質転換植物44個体は、いずれも不稔であった。このことから、導入した13.2kb断片は、少なくとも完全長のRf-1遺伝子を包含していないと考えられた。

#### 実施例8 XSF18由来の16.2kb断片に関する相補性試験

(材料および方法)

λファージクローンXSF18はXSF20と5'末端及び3'末端(各々、配列番号27の塩基20328及び41921)と同一だが、途中の塩基33947-38591を欠いている。よって、配列番号27の塩基20328-33946及び38592-41921を含む。これは、最初にクローンXSF18が単離されたが、単離後の増殖の過程で上記欠失を生じたことが判明したため、再度増殖をやり直すことにより、完全型のクローンを単離し、XSF20と命名したことに因る。

λファージクローンXSF18(図5)をNotIで完全消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された16.2kbの断片(配列番号27の塩基21065-33946及び38592-41921を含む)を、QIAEXII(QIAGEN社)を用いて精製した。

一方、プラスミドベクターpSB200をNotIで完全消化後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAをTE溶液に溶解後、CIAP(TAKARA社)により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII(QIAGEN社)を用いてゲルからベクター断片を精製した。

上記により準備した、XSF18由来の16.2kbの断片とベクター断片の二つの断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1(TAKARA社)を用いてライゲーション反応を行った。以後、実施例4に記載の方法に準拠して、形質転換植物を作成・調査した。

(結果および考察)

形質転換植物48個体は、いずれも不稔であった(図6)。このことから、導入した16.2kb断片は、少なくとも完全長のRf-1遺伝子を包含していないと考えられた。

#### 実施例9 XSG22由来の12.6kb断片に関する相補性試験

##### 5 (材料および方法)

λファージクローンXSG22(図1および5)をNotIで部分消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された12.6kbの断片(配列番号27の塩基31684-44109を含む)を、QIAEXII(QIAGEN社)を用いて精製した。

10 一方、プラスミドベクターpSB200をNotIで完全消化後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAをTE溶液に溶解後、CIAP(TAKARA社)により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII(QIAGEN社)を用いてゲルからベクター断片を精製した。

15 上記により準備した、XSG22由来の12.6kbの断片とベクター断片の二つの断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1(TAKARA社)を用いてライゲーション反応を行った。以後、実施例4に記載の方法に準拠して、形質転換植物を作成・調査した。

##### (結果および考察)

20 形質転換植物48個体は、いずれも不稔であった。このことから、導入した12.6kb断片は、少なくとも完全長のRf-1遺伝子を包含していないと考えられた。

#### 実施例10 XSG16由来の15.7kb断片に関する相補性試験

##### (1)

##### 25 (材料および方法)

λファージクローンXSG16(図1および5)をNotIで部分消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された15.7kbの断片(配列番号27の塩基38538-54123を含む)を、QIAEXII(QIAGEN社)を用いて精製した。

一方、プラスミドベクター pSB200 を Not I で完全消化後、エタノール沈殿により DNA を回収した。回収した DNA を TE 溶液に溶解後、CIAP (TAKARA 社) により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII (QIAGEN 社) を用いてゲルからベクター断片を精製した。

上記により準備した、XSG16 由来の 15.7 kb 断片とベクター断片の二つの断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1 (TAKARA 社) を用いてライゲーション反応を行った。以後、実施例 4 に記載の方法に準拠して、形質転換植物を作成・調査した。

#### (結果および考察)

形質転換植物 47 個体のうち、少なくとも 37 個体は、明らかに稔性を回復していた (図 6)。このことから、導入した 15.7 kb 断片のなかのイネ (IR24) に由来する部分である 15586 塩基 (配列番号 27 の塩基 38538-54123) が、完全長の Rf-1 遺伝子を包含していると考えられた。

#### (2) XSG16 内部の 11.4 kb 断片に関する相補性試験

##### (材料および方法)

λファージクローン XSG16 を AlwNI および BsiWI で完全消化後、エタノール沈殿により DNA を回収した。回収した DNA を TE 溶液に溶解後、DNA Blunting Kit (TAKARA 社) により平滑化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけ、分離された 11.4 kb の断片を、QIAEXII (QIAGEN 社) を用いて精製した。

プラスミドベクター pSB11 (Komari et al. Plant Journal, 1996) を SmaI で完全消化後、エタノール沈殿により DNA を回収した。回収した DNA を TE 溶液に溶解後、CIAP (TAKARA 社) により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII (QIAGEN 社) を用いてゲルからベクター断片を精製した。

上記により準備したふたつの断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1 (TAKARA 社) を用いてライゲーション反応を行った。

反応後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAを純水（Millipore社製装置により作成）に溶解後、大腸菌DH5 $\alpha$ と混合し、エレクトロポレーションに供試した。エレクトロポレーション後の溶液を、LB培地で振とう培養（37°C、1時間）した後、スペクチノマイシンを含むLBプレートに広げ、加温（37°C、16時間）した。生じたコロニーのなかの14個  
5 について、プラスミドを単離し、制限酵素断片長パターンおよび境界部塩基配列を調査することにより、所望の大腸菌を選抜した。

上記により選抜した大腸菌を、*Agrobacterium tumefaciens* 菌株LBA4404/pSB4U（高倉ら、特願2001-26998  
10 2（WO02/019803 A1））およびヘルパー大腸菌HB101/pRK2013（Ditta et al, 1980）とともに供試して、Ditta et al（1980）の方法に従い、三菌系交雑（triparential mating）を行った。スペクチノマイシンを含むABプレートに生じたコロニーのなかの12個について、プラスミドを単離し、制限酵素断片長  
15 パターンを調査することにより、所望のアグロバクテリウムを選抜した。

上記により選抜したアグロバクテリウムを用いて、Hiei et al  
（1994）の方法に準拠し、MSコシヒカリ（BT細胞質を持ち、核遺伝子はコシヒカリとほぼ同一）の形質転換を行った。形質転換に必要なMSコシヒカリの未熟種子は、MSコシヒカリにコシヒカリの花粉をかけることにより作成し  
20 た。

形質転換植物は、馴化後、長日条件の温室に移した。移植適期まで育成した後、120個体の植物を、1/5000アールのワグネルポットに移植し（4個体/ポット）、移植約1か月後に短日条件の温室に移した。出穂約1か月後に、各個体から標準的な穂を1穂サンプリングし、種子稔性（総もみ数に対する稔実  
25 もみの割合）を調査した。

（結果および考察）

形質転換植物120個体のうち、59個体が10%以上の種子稔性を示し、そのうち19個体は70%以上の種子稔性を示した。このことから、導入した1  
1.4 kb断片（配列番号27の42357番目の塩基から53743番目の塩

基まで) が、稔性回復の機能を発現するうえで必須の R f - 1 遺伝子領域を包含していると考えられた。

### (3) X S G 1 6 内部の 6 . 8 k b 断片に関する相補性試験

#### (材料および方法)

- 5 λファージクローン X S G 1 6 を H p a I および A l w N I で完全消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された 6 . 8 k b の断片を、Q I A E X I I (Q I A G E N 社) を用いて精製した。

プラスミドベクター p S B 1 1 の調整を含め、以後の過程は上記 (2) に記載の方法に準拠した。

#### 10 (結果および考察)

形質転換植物 1 2 0 個体のうち、6 7 個体が 1 0 % 以上の種子稔性を示し、そのうち 2 6 個体は 7 0 % 以上の種子稔性を示した。このことから、導入した 6 . 8 k b 断片 (配列番号 2 7 の 4 2 1 3 2 番目の塩基から 4 8 8 8 3 番目の塩基ま

- 15 いると考えられた。

### 実施例 1 1 X S G 8 由来の 1 6 . 9 k b 断片に関する相補性試験

#### (材料および方法)

- λファージクローン X S G 8 (図 1 および 5) を N o t I で完全消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された 1 6 . 9 k b の断片 (配列番号 20 2 7 の塩基 4 6 5 5 8 - 6 3 3 6 4 を含む) を、Q I A E X I I (Q I A G E N 社) を用いて精製した。

- 一方、プラスミドベクター p S B 2 0 0 を N o t I で完全消化後、エタノール沈殿により DNA を回収した。回収した DNA を T E 溶液に溶解後、C I A P (T A K A R A 社) により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気 25 泳動にかけた後、Q I A E X I I (Q I A G E N 社) を用いてゲルからベクター断片を精製した。

上記により準備した、X S G 8 由来の 1 6 . 9 k b 断片とベクター断片の二つの断片を供試して、DNA L i g a t i o n K i t V e r . 1 (T A K

ARA社)を用いてライゲーション反応を行った。以後、実施例4に記載の方法に準拠して、形質転換植物を作成・調査した。

(結果および考察)

形質転換植物48個体は、いずれも不稔であった。このことから、導入した16.9 kb断片は、少なくとも完全長のRf-1遺伝子を包含していないと考えられた。

#### 実施例12 XSH18由来の20.0 kb断片に関する相補性試験

(材料および方法)

λファージクローンXSH18(図1および5)をNotIで完全消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された20.0 kbの断片(配列番号27の塩基56409-76363を含む)を、QIAEXII(QIAGEN社)を用いて精製した。

一方、プラスミドベクターpSB200をNotIで完全消化後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。回収したDNAをTE溶液に溶解後、CIAP(TAKARA社)により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII(QIAGEN社)を用いてゲルからベクター断片を精製した。

上記により準備した、XSH18由来の20.0 kbの断片とベクター断片の二つの断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1(TAKARA社)を用いてライゲーション反応を行った。以後、実施例4に記載の方法に準拠して、形質転換植物を作成・調査した。

(結果および考察)

形質転換植物44個体は、いずれも不稔であった。このことから、導入した20.0 kb断片は、少なくとも完全長のRf-1遺伝子を包含していないと考えられた。

#### 実施例13 XSG8およびXSH18の重複部由来の19.7 kb断片に関する相補性試験

(材料および方法)



実施例 1 1 におけるライゲーションによって得られた所望の大腸菌から単離したプラスミド (XSG8SB200F) を、SalI および StuI で完全消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された 12.8 kb の断片 (配列番号 27 の塩基 50430-63197 を含む) を、QIAEXII (Q  
5 IAGEN 社) を用いて精製した。

一方、実施例 1 2 におけるライゲーションによって得られた所望の大腸菌から単離したプラスミド (XSH18SB200R) を、SalI、StuI および XhoI で完全消化し、アガロースゲルによる電気泳動を行った。分離された  
10 6.9 kb 断片 (配列番号 27 の塩基 63194-70116 を含む) を、QIAEXII (QIAGEN 社) を用いて精製した。

さらに、プラスミドベクター pSB200 を EcoRV で完全消化後、エタノール沈殿により DNA を回収した。回収した DNA を TE 溶液に溶解後、CIAP (TAKARA 社) により脱リン酸化した。反応液をアガロースゲルによる電気泳動にかけた後、QIAEXII (QIAGEN 社) を用いてゲルからベクター  
15 断片を精製した。

上記により準備した、XSG8 由来の 12.8 kb の断片、XSH18 由来の 6.9 kb の断片、及びベクター断片の三個の断片を供試して、DNA Ligation Kit Ver. 1 (TAKARA 社) を用いてライゲーション反応を行った。ライゲーション産物は、XSG8 および XSH18 の重複部由来  
20 の 19.7 kb 断片 (配列番号 27 の 50430-70116 を含む) (図 5 の XSX1) を含む。以後、実施例 4 に記載の方法に準拠して、形質転換植物を作成・調査した。

(結果および考察)

形質転換植物 40 個体は、いずれも不稔であった。このことから、導入した 1  
25 9.7 kb 断片は、少なくとも完全長の Rf-1 遺伝子を包含していないと考えられた。

## 請求の範囲

1. 配列番号 27 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基配列と  
 5 少なくとも 70% 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸をイネに  
 導入することにより、イネの稔性を回復する方法。
2. 配列番号 27 の塩基 38538-54123 の塩基配列を有する核酸、  
 又は配列番号 27 の塩基 38538-54123 の塩基配列と少なくとも 70%  
 10 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸をイネに導入することによ  
 り、イネの稔性を回復する方法。
3. 配列番号 27 の塩基 42132-48883 の塩基配列を有する核酸、  
 又は配列番号 27 の塩基 42132-48883 の塩基配列と少なくとも 70%  
 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸をイネに導入することによ  
 り、イネの稔性を回復する方法。
- 15 4. 配列番号 27 の塩基配列又は配列番号 27 の塩基 38538-5412  
 3 の塩基配列と、少なくとも 70% 同一の塩基配列が、以下の条件 1) 及び 2)  
 の少なくとも一つを満たす、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法：
  - 1) 配列番号 27 の塩基 45461 に相当する塩基が A である；及び
  - 2) 配列番号 27 の塩基 49609 に相当する塩基が A である。
- 20 5. イネに導入される稔性回復遺伝子座を含む核酸が、稔性回復遺伝子以外  
 の構造遺伝子を含まない、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の方法。
6. 稔性回復遺伝子 (Rf-1 遺伝子) の機能の有無を決定する配列がイネ  
 第 10 染色体上の多型検出用マーカー座 P4497 Mb o I と B56691  
 Xba I の間に存在することを利用して、被検定イネ個体又は種子が Rf-1 遺  
 25 伝子を有するか否かを識別する方法。
7. 稔性回復遺伝子が、配列番号 27 の塩基配列からなる核酸、又は配列番  
 号 27 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列からなる核酸中に存在す  
 る、請求項 6 に記載の方法。

8. 稔性回復遺伝子が、配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列からなる核酸中に存在する、請求項 6 に記載の方法。

5 9. 稔性回復遺伝子が、配列番号 27 の塩基 4 2 1 3 2 - 4 8 8 8 3 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 4 2 1 3 2 - 4 8 8 8 3 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列からなる核酸中に存在する、請求項 6 に記載の方法。

10. 配列番号 27 の塩基配列又は配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3 の塩基配列と、少なくとも 70% 同一の塩基配列が、以下の条件 1) 及び 2) の少なくとも一つを満たす場合に被検定イネ個体又は種子が R f - 1 遺伝子を有すると判断する、請求項 7 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の方法：

- 1) 配列番号 27 の塩基 4 5 4 6 1 に相当する塩基が A である；及び
- 2) 配列番号 27 の塩基 4 9 6 0 9 に相当する塩基が A である。

15 11.

i) 以下のいずれかの塩基、

- 1) 配列番号 27 の塩基 4 5 4 6 1 に相当する塩基；又は
- 2) 配列番号 27 の塩基 4 9 6 0 9 に相当する塩基；

を含む隣接領域の塩基配列に基づいて、上記塩基と隣接領域の双方を増幅するようにプライマー対を作成し；

i i) 被検定イネ個体又は種子のゲノム DNA を鋳型として核酸増幅反応を行い；そして

i i i) 前記核酸増幅産物に見出される多型に基づいて被検定イネ個体又は種子が R f - 1 遺伝子の有無を識別する、請求項 7 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

12. 工程 i i i) が、以下の条件 1) 及び 2) の少なくとも一つを満たす場合に被検定イネ個体又は種子が R f - 1 遺伝子を有すると判断する、請求項 1 に記載の方法：

1) 配列番号 27 の塩基 4 5 4 6 1 に相当する塩基を含む領域が、T a q I 認識配列を有しない；及び

2) 配列番号 27 の塩基 4 9 6 0 9 に相当する塩基を含む領域が、B s t U I 認識配列を有しない。

5      13.      配列番号 4 5 及び 4 6、並びに、配列番号 4 7 及び 4 8 からなるグループから選択される塩基配列を有するプライマー対を使用する、請求項 11 又は 12 に記載の方法。

10      14.      配列番号 27 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸、に対し相補的な塩基配列から選択される、連続した少なくとも 100 塩基の長さのアンチセンスを導入することにより、R f - 1 遺伝子の稔性回復機能を抑制する方法。

15      15.      配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸、に対し相補的な塩基配列から選択される、連続した少なくとも 100 塩基の長さのアンチセンスを導入することにより、R f - 1 遺伝子の稔性回復機能を抑制する方法。

16.      配列番号 27 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸。

20      17.      配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 3 8 5 3 8 - 5 4 1 2 3 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸。

25      18.      配列番号 27 の塩基 4 2 1 3 2 - 4 8 8 8 3 の塩基配列を有する核酸、又は配列番号 27 の塩基 4 2 1 3 2 - 4 8 8 8 3 の塩基配列と少なくとも 70% 同一の塩基配列であって、稔性回復機能を有する核酸。

1

RFLP Probe (S12564)

□

Probe A ■ Probe E ■ Probe F ■ Probe G ■ Probe H ■

WSA 1

WSA 3

WSE 8

WSF 5

(1) あそみのり

WSF 7

WSG 6

WSG 2

XSE 1

12481

XSE 7

2618

17261

XSF 4

12478

33750

XSF 20

20328

41921

XSG 22

31684

48847

XSG 16

38538

54123

XSG 8

46558

63364

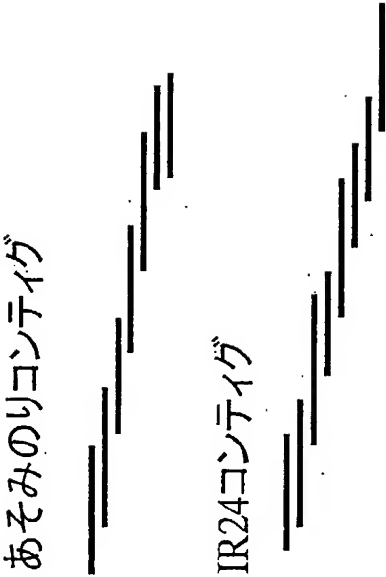
XSH 18

56409

76363

(2) IR24

図 2



AC068923

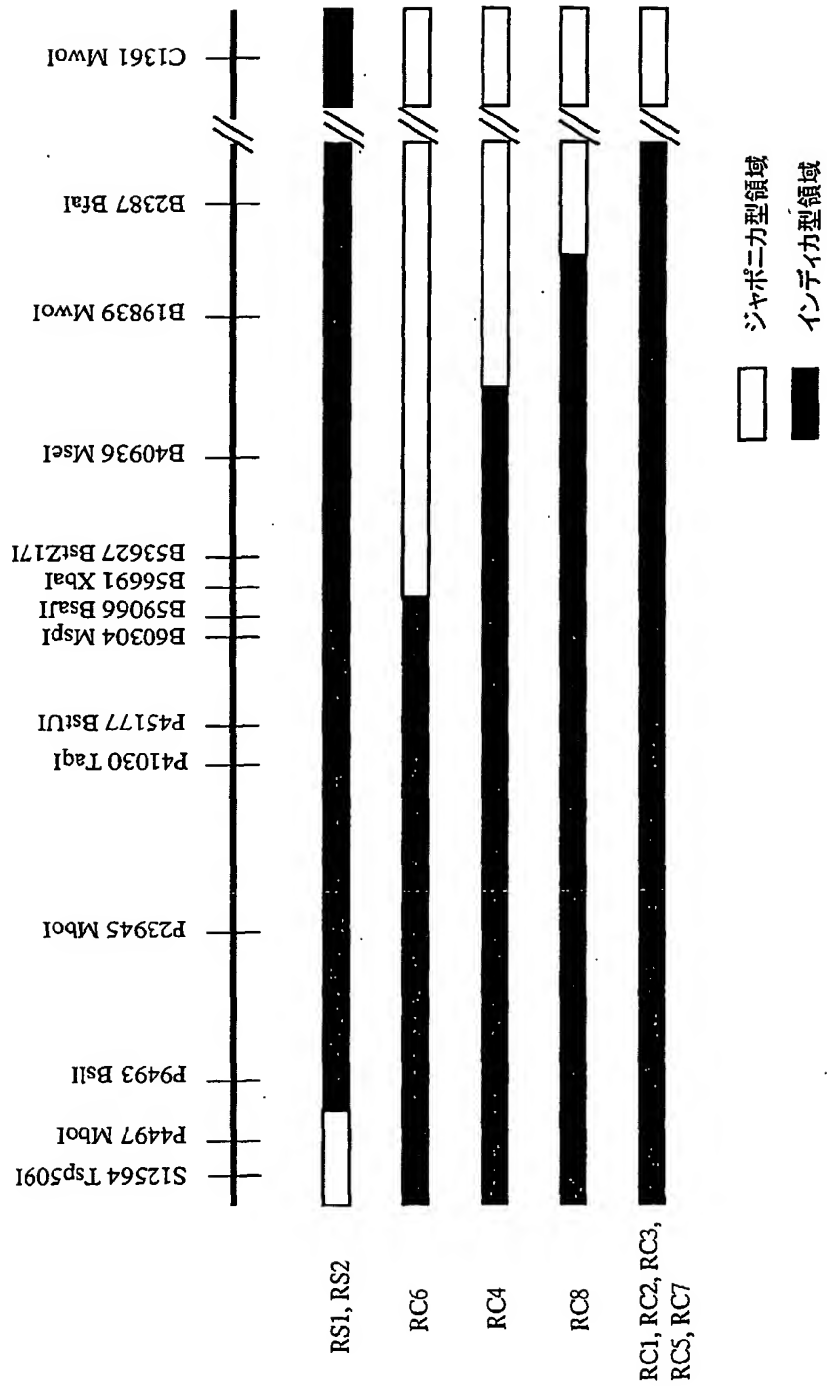
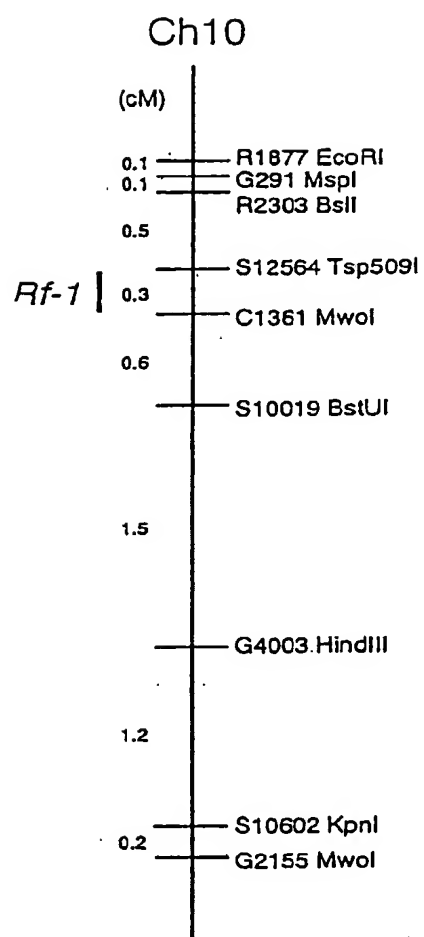


図4





5

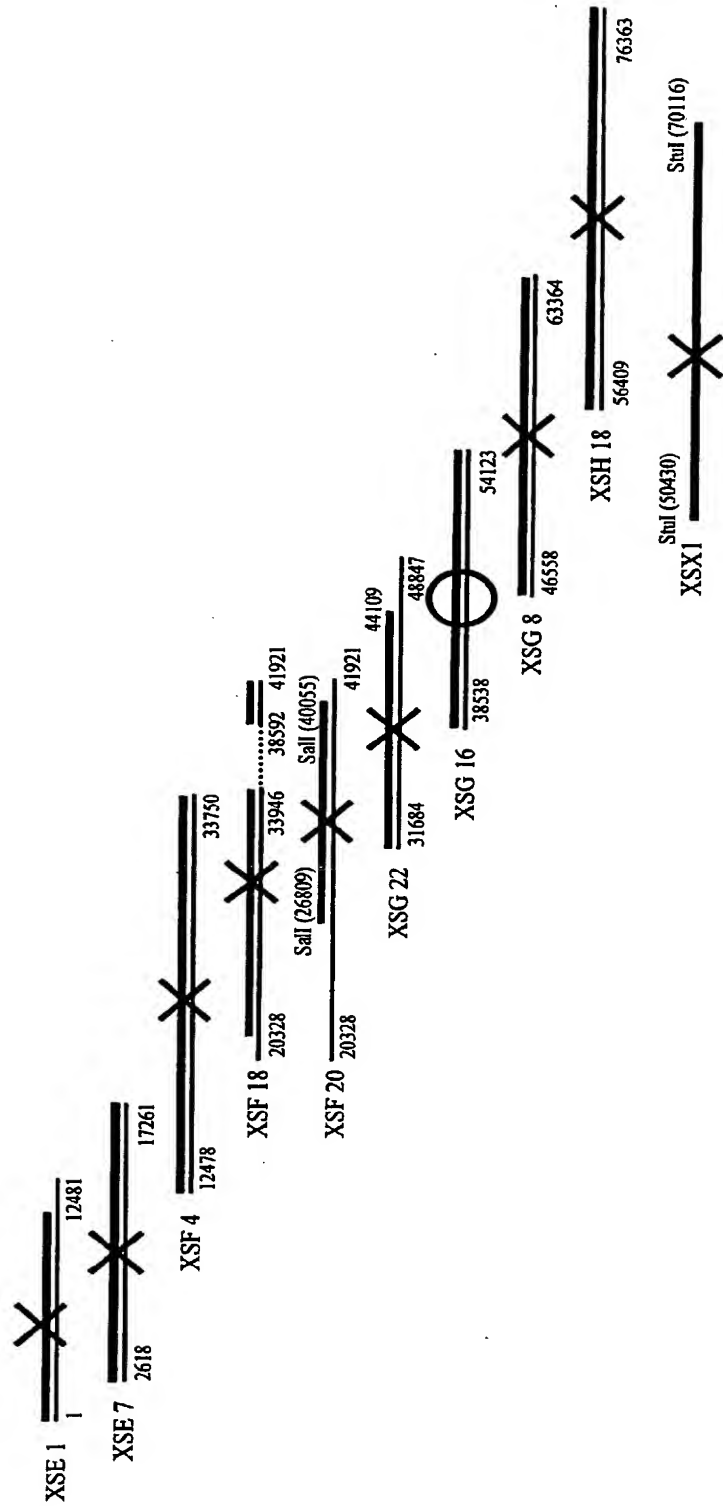
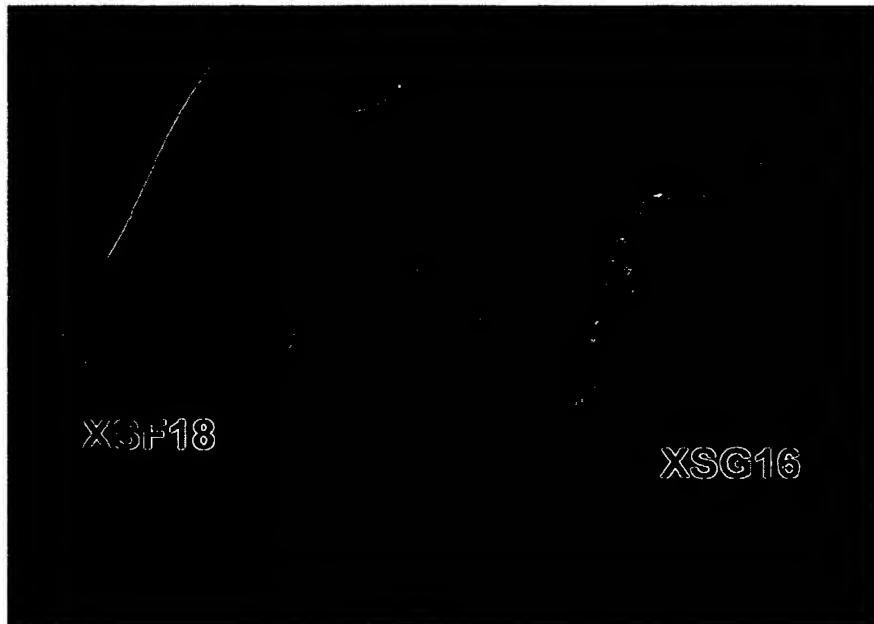


図 6



## SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN TOBACCO INC.

Syngenta Limited

<120> A method for providing and controlling the rice fertility, and discerning the presence of the rice restorer gene by using the rice restorer gene to the rice BT type cytoplasmic male sterility.

<130> YCT739

<150> JP 2001-285247

<151> 2001-09-19

<150> JP 2001-309135

<151> 2001-10-04

<150> JP 2002-185709

<151> 2002-06-26

<160> 68

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of R1877 EcoRI marker sequence.

<400> 1

cattcctgct tccatggaaa cgtc 24

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of R1877 EcoRI marker sequence.

<400> 2

ctctttctgt atacttgagc ttgacatct gac 33

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G4003 HindIII marker sequence.

<400> 3

gatcgacgag tacctgaacg 20

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G4003 HindIII marker sequence.

<400> 4

aatagttgga ttgtcctcaa aggg 24

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of C1361 MwoI marker sequence.

<400> 5

aaagcaaccg acttcagtgg catcacc 27

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of C1361 MwoI marker sequence.

<400> 6

ctggacttca tttccctgca gaggc 24

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G2155 MwoI marker sequence.

<400> 7

gaccaccaat taactgatta agctggc 27

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G2155 MwoI marker sequence.

<400> 8

tttctggctc caataatcag ctgtagc 27

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G291 MspI marker sequence.<400> 9

ctgctgcagc aagctgcacc gaaccgg 27

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G291 MspI marker sequence.<400> 10

acattttttc ttccgaaact tccg 24

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of R2303 BslI marker sequence.

<400> 11

atggaaagat acactagaat gagc 24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of R2303 BslI marker sequence.

<400> 12

atcttatata gtggcaggaa agcc 24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of S10019 BstUI marker sequence.

<400> 13

aacaatctta tcctgcacag actg 24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of S10019 BstUI marker sequence.

<400> 14

gtcacataga agcagatggg ttcc 24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of S10602 KpnI marker sequence.

<400> 15

agctgttgag agttctatgc cacc 24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of S10602 KpnI marker sequence.

<400> 16

tagccatgca acaagatgtc atac 24



<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of S12564 Tsp509I marker sequence.

<400> 17

ctagtttagac cgaataactg aggttc 26

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification of S12564 Tsp509I marker sequence.

<400> 18

tttgtggggtt tgtggcattg agaaaat 27

<210> 19

<211> 2240

<212> DNA

<213> Oryza sativa L.

<223> PCR marker G4003 HindIII

<400> 19

gcggccgctc cgggaagtcg agcgagtaga cgcccctgac gccgtacgcg tcggcgagcc 60

gcagcggcgt ctctggcggt gtgaaggaca gcccggtcag cgtcgcgcgg cgccgcccgt 120

```

tgatcgtcac cggcgccgtg ctccgcagca ggtacgcctg cgtcacgttg atcgacgagt 180
acctgaacga tccctgtggg ttccggcctcg ccgctccggc actcaggttc cacctgcccc 240
atgcaaaaaa ccaaaaccca aaagcttaat gcgaataata catcattcca cgtattttaa 300
aaaataatth ataggtaaaa tttttataat gtatttttagc gacgtaaatg tcaatgctga 360
gaaataaacg ataatacttt aaatgaagtt ctaaaattta aatttttgca tcggttgatg 420
ttggataaag aaaacgatgg aggctagtaa tttttcttct tttttaagta tctagattgt 480
catatatgta atttttcagt ttttcatccc tttaggagca atccaactat tattttcctt 540
ttcttatgta aaaggttgaa caacatattc aaacataaaa aaataaaaatt aaatgaaata 600
aatttacaat tcataaaaatt tacagaatth atgttaagaa aatattcaaa cttagataat 660
aataaagcaa caaaatcgta ctaaaaagaa gtataattgt acattgtata ctactactcc 720
tacaatttta gacttagaat ttttaatttc ctgaaatcta gtaatgcat ttttttcttt 780
ctagttgaac cagacagtaa gtttaactcg aaacttataa gctaatgagc gaagtcgggc 840
aattcactcg tacctgacgg agcgagcttg gttcatggag aaggacttgt cgaactggtc 900
ctggggaggg tcggggagcg ggccggaggc ccgcccccgg gagttggagt agcggaggac 960
ggcgacgccg gcgacgcggc gccacacggt gtcgttcacc atgcgcgcgc tggcgacgac 1020
gtagtagtcg gagctcgcgt tctggtcggt ggtgacgagg aaggagtagg actggccgac 1080
gtggacgtcc aggttggtgt agttctgctg cgtcgtgtag gagccctccg tctccaccag 1140
caccatgttg tgcccttgga tctgaagtt gaggctcgtc gacgtcccca cgttgatcac 1200
tcggatcctg tacgtcttgc ctgtgtcccc acaccgacgt cgccgacaca cgcgcaaaag 1260
ataatagact cattgtaagt aggtagtaac cttctccgtt tcatattata aatcgtttga 1320
ttatatthtt gttagttaaa cttctttaag ttttttttct ataaacttaa ttaaacttaa 1380
agaattthta taaaaaaaat caaacgactt ataataaaa atggatggag tagttgcatc 1440
aatttggtga tgaagcaaac aagattatat ctttttcatg agggtgaaag tattcagtga 1500
acaattcgtc agtttcaagt ttcatagaat cggacagggt ctctgaaagt ctgtatthtt 1560
ggtactgttg gattgactac tctggcttct gttgtcacat cttttgtatc ctagtttcgg 1620
taaaaaaaat tttggcattt ttactcctat cgttgatctg ttttaactgaa accattgcat 1680
gatatactac tagcagacaa aactgggtgaa aattcacgag aatgaactth ttgtcagtta 1740
agcattagcg gacagcttca gtaagcagag caggctgcct taaggcttaa agcactatct 1800
tccacaacac tttgtcctac aatcaaattc caaatttact atcacaaaa gcgaaggaac 1860

```

taactaaacc ttactcctac tagtactact gctatgacta tgaaacaaga ttccaatcca 1920  
 aagaaaacac agtgctcgat cagcatgata aaagcaacga aacctgctca tccagctgcc 1980  
 aaaatgccac cccactgact ctacgtacgt actacgtatt gacgctgtaa aaaactagcc 2040  
 gtagtacaga gaagaggacc caaagtttcg tcaaaaattt tattttaccc ggatccacat 2100  
 tgatggtctc gtactcgatg ccggccggga caaggctgtc gttgtacctg tacgggccct 2160  
 tgccgttaat cagcacgccg tccggcatcc cgaggctcct gccactgtcc agcatcttcc 2220  
 tcagatcctg caacgaattc 2240

<210> 20

<211> 2601

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.

<223> PCR marker C1361 MwoI

<400> 20

tcttctgag atccaagtg cggtaacttt gcccttttct ttttttcttc tcttctgaat 60  
 tttttcatgg tttttgggag agattttcgt aacttgatta cagttctagg aaaaggccac 120  
 cttgttcaaa cagggtcttc ttgaaaggga tcaatttgct aggagtacat gattctaaaa 180  
 gcgatttcga aataaaacac agttctcgat ctcatacctg aaaacaaaag gcccatactg 240  
 tgtaaaactgt gattatgctt ctgttaaagt ggatatttgt acaaaattga cgccaaccac 300  
 ctataaacag attgtgagct tttatcttag taaaataaaa tgtgacattc tactcagtgt 360  
 tcagtgatcc gatgtcgtct cttctgcgta caacttctaa cagccgtttt cggtagtaca 420  
 aactagcgaa acaccaaaaa cgcagcattt gagttctgga atacgtgaa attgttagaa 480  
 tcaaccacga aaccaaatac attgttcaga aacgttgcaa cgagataaaa cacaagaact 540  
 tgttttaaca aagcatagcg acagtacata tacggttaca acaccagtc tttatacagt 600  
 tctgctggag ttccatctac tggtgtcat tgtatctcag gacagacagg ttaacatagg 660  
 tacaacacaa ttacaggcta aaccgaagcg aactacactg tcagcatctc taacagtatc 720  
 gtcaagcaag cttatttaca gctgctctag taaatttaca acgtccctgg cagaatccct 780  
 ctcgtttctg gcagcgacga ggcacgggtc atggccttag caggacatct caccggtcag 840  
 ctgcatagaa agcaaccgac ttcagtggaa tcacctcctg ctcttgcaaa aaagttgggt 900

cgatcaatca cgcgtttaat ccaaaacaaa atgggtatta attatgctag cctatgaagc 960  
 tacctcagag ttctctatatt gctctgcagg gaaatgaagt ccagtggaaac agttctcaag 1020  
 cacctcaggg ctcttcatcc atgctttgtg tgcttcaatg gctttcagct tatagcgaaa 1080  
 catctgcgat acggatctaa aattaaggat gtcgacaatt acttaacaca acaaataatt 1140  
 gaagcaggtc cagttaaaga aaagtagcag cgaagaatag cactctgaag tctgaacctc 1200  
 agataaagaa atggttggtt tttccagttc atctccctca acatggattc cagtaccctg 1260  
 gcattctggg caaaggatgg atgttatttt cttaggtgca ttttttgcct ttcttctctg 1320  
 attgcttttt cccttgcttg caattttgtc tgctagcatc tcatattggc ataaaatagt 1380  
 ccagtgcaca aggcaagaag tgtgaaacaa atgaaatgcc tgcaaaatta gccgtacaaa 1440  
 gtcattggag gttgcagcag aatactacaa atttttaag aagaaactat acactgtcta 1500  
 tgttttgctt gaaatgaatt caaccacttt gcattatacg gtttggaatc cctggtttgt 1560  
 gagaactgta attccattac aacagtgaag aagttacat aactaatgaa tggaaattag 1620  
 tcaaatgcct aatttttttag gtttgcttta atttatttat ctgtgagaaa tgctaagcat 1680  
 gtcatgcgtt gctatcttca agaaatacta agaaactgca aaggcaaaga atgtttgaaa 1740  
 taacttacct cgttgagtt tctactgctg caggctagat ttctgtctt gcagttgagc 1800  
 aaggtagcta catccttttc aagaagcatt ggtcgccac aaatatcaca agctttctca 1860  
 gcagcaaggc gcttctgctt acgcaactcc ctctcatag atttggtgga taagaggcca 1920  
 acttgaagat tgtgtgaagt acctgtcggg gaacctgtta tgatagcttg gctattgtca 1980  
 tgggcggagc tgctttgctc attcgactcc tctgaagatg cttcttgatc tgaaaatgac 2040  
 ttctttcttc tctttccacg gtgtccagca tcatcaatca cgaagaaaga tccagcagag 2100  
 ataggaaggt cctgatcatc agaagaccac ttctgcca actcaattgt ataagagaag 2160  
 ttgacaatgg caaagtcaga ttgctcatag gtgtcacact catccaagcc atgggagcca 2220  
 tctgtccta cccaagcaca ccagatcttg ctaatctttt tacttctttt gctagcttcc 2280  
 cataacctgt atgcaatatt tccatatccc aaaagatgca caggcaaate cgaaacaaca 2340  
 tccttttagca atacactagg aataacgaga ggaccgtcag ttccactttg gtttgacagc 2400  
 acatgatctt cagatacaga agcagttcta ccattacat gcgcatttgc accacggcgt 2460  
 gtgccttttg cgccattgag agagctagaa tcatctctca acctcgaagt cacttcagtg 2520  
 tcgttcgctg gaaccagagc cagctctctg gtgttctgag agctcgagtc cagcaagagc 2580  
 gggtccttct cgcgcgagtt g 2601

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 1333

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa* L.

&lt;223&gt; PCR marker G2155 MwoI

&lt;400&gt; 21

```

ccctctgctt gatccagtgt acatccatgg gttaggacag attagttact cagttaatta 60
agtgtgagac tggaaaaaaaa tatctgacgg cagttttata agttgagtga ttgaactagt 120
gaaagttcag ttaactgtca acggctgtag atttgggatg gcagactggt ctgagtcaaa 180
atgaagcttt tactgtgcgt ggttaccagg tgcagtaaaa taatttcaga tctaatcgca 240
gtaaaaaaaaat gtagtactat atgttaagac gagattgggtc ggtcaaaatc tatctggccc 300
tttacatctc ccaaagtta cctcagttgc aggtggtaaa aaaaaatcac tcgtttcacg 360
tgatgtcggc agatcatgga ccatgtctca aatgctgaaa ctctgaacaa tcaacaaaaa 420
aatccaacca gatgagctgt gcaactgata attgatcatc acactatttg caactcatct 480
ttcatgtaga tggaacttca atcccgaaga aataatgaca gcaaaatgct gcgatcctga 540
agaaaggatg gcggcaaaat ggcagcgata aaaaaaaaaat ggttggttac tgaagaatta 600
tttgtgcagc agttgagaca gtagcaagat aagagctagc taagctagct aggtagagtt 660
ggatggaaga gtagtagtat gagatagagc atggagcgcg acaactcaag tggatgctaa 720
agtaaaaggc attctcttct cttgtttgga atcagaaaag aaaagaaaag acttgagctg 780
cttggtctgga atgtttggtt ggatcatgcg cgctctcctt agcttagctc gccaaagaaat 840
cctcgcttca tctctctcaa taattcaaag ccacgagctc tctgctcata tccagtgcga 900
cgattcccgt taatgcaaat gcattatata cagttcgaaa tgttacaatt cttgcgtttg 960
cagcaagcca gcaagtgggtg tgaattgttt aatccctcgt gcatttcaac gaaattctct 1020
caciaattcg cattgacttc tttcttagca caattagtaa gcagtgacaa ataaagaatt 1080
tttgaacagg atgtctttcc aaggaagggtg agatttttta tgtggatagc aaggatcgcc 1140
tttccttagc atgaagagaa tgtgatcaac ttacacctt gcttacgatt atggccttaa 1200
tttttgatac cctaaacagg agcacatcac atgcatgtcg acctgagacc accaattaac 1260
tgattaagtt ggcatttcag atgcatccgt cagttacatg atcaggtgat cgatggatca 1320

```

actgtaggtt tca

1333

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 863

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa* L.

&lt;223&gt; PCR marker G291 MspI

&lt;400&gt; 22

```

cgaacaggat caaaagtaga cgacgagggc atttagaagg agaggaattg tatttggtcc 60
cggtatttaa tttttaaaatt tgtggtcgga agtttcggaa gaaaaaatgt gctcatgagt 120
gattattggc tctgaacacc aacctctctt ttcgttgatt ccttctgagg tggtgggtgt 180
tgggacacga tgctgccgcc gacacgacac cgggttcac aatacactaa tctactcgcg 240
acaccttcat tgaactgcat ataattattht agaaagtcca ttaacacatc ttataaaacc 300
ttgttgaatc atataatcat tctataaagt ctatttgaac atcttatgaa aaaataagat 360
ctgacctagt cgttacactc tcttacattht tccattagcc taactaatthc cgtgcaggaa 420
acgccccaaa ataatagtag caatagthca ctaatcccggt gccagaggcc gccaatgatt 480
agtgattaac ccaaaaaaca taatcatcat cacacgccgc taatgaccag ctctcgctta 540
gctcatccca caggcggccc ccacacgcca ctcttgccat gtgggcccac ctttcacacc 600
ccccaccaac cagaaaaaaa actcccccaa aaaaaaaact tttaatgctt atctcgcggc 660
agtataaaag gcgacccccc caccacaca caatcacagt cagcgaccca acccaacccg 720
agccgaggag tcgagtcgtg tgaaaattac gaaattgccc ttcgactcca ccaccaccac 780
ccaccggcga ggcgaggaga ggagaaaaat tgggaggaaa aaaaaaggga aaaagaaaaa 840
gggtggagga gatttttgcg aag 863

```

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 1510

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa* L.

&lt;223&gt; PCR marker R2303 BslI

&lt;400&gt; 23

```

tgccatgaag acctatggaa agaatatctt cttctcactc tgtgaatggt gagtttactc   60
tctgtaacat ttagggctag gtcgaaggaa catgaagcat tgctgattca ctccactgtg  120
tttttttttt ctgtataggg ggaaagaaaa tcctgctaca tgggcaggcc gcatgggtaa  180
cagctggaga acaactggcg acatcgccga caactggggc aggttctact catcctctct  240
ttaaccctgt ttacatagtt cttgagtttt tcagtactga tcgtaattgc cctgttattt  300
cagtatgaca tctcgtgcag acgaaaatga ccaatgggct gcctatgctg gacctggtgg  360
atggaatggt aagaacttga gatgtatctg ttcctagggt gcttaaccat ttgagagctt  420
caaaatgac aacatatgtt tctgctgtgc aatatcagat cctgacatgc ttgaagtggg  480
aaatgggtggg atgtctgaag ctgagtaccg gtcacacttc agtatctggg cactagcaaa  540
ggtaccatag catgttctat gtactaataa ttttgctgca atgttgaact tctttgcatt  600
tcctcactgc aagttttgct tgaattgttc aggctcctct tttgatcgga tgcgatgtgc  660
gctcaatgag ccagcagacg aagaacatac tcagcaactc ggaggtgac gctgtcaacc  720
aaggcaagcc ttctcagttt cacatgctta gatttagcca tacctcttgg atatttcacc  780
atactcataa tgtaactctc tgaacagata gtctagggtg ccaaggaaag aaagtacaat  840
ctgacaacgg attggaggta tcccttcaat ggcttccaaa tttgcagttt ctcattgtcc  900
cataagcctt ggcatgatca tgactaactc tgaagctgac aatactttgt gtaaatttgt  960
cggtaggttt gggccggggc actcagcaac aacaggaagg ctgtggtgct ctggaacagg 1020
cagtcatacc aggcaaccat cactgcacat tggtcgaaca tcgggctcgc tggatcggtc 1080
gcggtcactg ctcgtgatct atgggcggta aagcctttgc tttcttcaga gctcaaagta 1140
gaacatcttc tcttcagaat tcagagttca taacaaattt ctgtcaattg tgcagcactc 1200
ttcgttcgcg gctcaggac agatatcagc atcgggtggcg cctcatgact gcaagatgta 1260
tgtcttgaca ccaaactagt cagcaaagaa aagcagcaca ggtagtacg tgtccggcga 1320
atacagctaa attgatcagg attcaggaag aaggtttgca atttgcaagg attggtagag 1380
ctggaaatgg gatgccattt ggttatgtat gtagaaataa gctgtaagcc tgtaagcgta 1440
tatgtaatca gccgtcaaat gctggcgagt gtatttctga agtttgcaac gaaagttgca 1500
gcaataaaaa                                     1510

```

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 1016

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa* L.

&lt;223&gt; PCR marker BstUI

&lt;400&gt; 24

```

tggggattct tttctttaag caatttaaca ttattgtcct aacaatatac acaatattgg    60
tttttctttc agtatcaa atattctttta cttttgaaaa cacatttgca atgtgttgga    120
aacacaatta tatcttgca ttccttttgg aaatttaatc atttgaaaac tgattcgcg    180
ttcatggctg taatcttctc ttgcgaacat cgctctttct ttgatggttc tctgttgaga    240
agaagagcaa ccaagtaa atttcgaaatg tttttttgtt ctttctattc accattgcag    300
gttgtcaaag ccatcgagaa ggccataccg attccgagag cgcaacccat tgccttgga    360
ggcccagcaa gggaagagct gaaggccatg gaggcgcaga aggtcgagat cgaccgcacc    420
gcggcgctcc aggtgcgccg tgagctttgg ctggggctgg catacctcgt cgtccagact    480
gccggcttca tgaggctcac attctgggag ctctcatggg atgtcatgga acccatctgc    540
ttctatgtga cctccatgta cttcatggcc ggctacacct tcttcctccg gaccaagaag    600
gagccctcct tcgagggtt cttcgagagc cggttcgcgg cgaagcagaa gcggttgatg    660
cacgcccggg atttcgatct ccgccggtat gacgagctcc ggcgagcctg tggcctgccg    720
gtggttcgga ctccgacgag cccctgcaga ccgtcgtcgt cgtcgtcgtc gtcttcgacg    780
caggagagcc attgccattc ttactgccat tgccaatgat ctttgtgctg ttctgttctg    840
ttgtcagaat tttttcatgc ccagtttatg ggggttaagc tagcttctcc attgtaccgt    900
tctgatgtgc ggatgatgcg atgcaaagca tagtttggtg aagagatgac aaggcagatt    960
ttagcttgaa aacctggagg tgagaaaaaa aaatcctgat gtgtttgtgt gtgtga      1016

```

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 676

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa* L.

&lt;223&gt; PCR marker S10602 KpnI

&lt;400&gt; 25



```

accaccttca tatgaagaaa ttaacggtgt tttcatgagg aatccaacag tcgctgaatt 60
ggtggaaaact gtggaattct tcttggctga ggtaaccaat catcacttca ccacaatgca 120
caagtttgta gcttactact acagtacttc taataagttt tgtctgttga gatatttattg 180
ctgattttcta tgcattggta tctttttgac aggccatcca gtcttatcgt gctgagagtg 240
aaactgagct caacctggca gctgggtgact atatatgttg cgggaaggta cggccctatc 300
ttcccatagg acatgtttct aaccataaac atatctttgc tggacttttg tgggcaaagt 360
tggtacact aaacttgtgt tcattaacct gctcaatcag gtgtcaaaca atggatgggc 420
agaagggtgaa tgcagaggga aagctggctg gttcccttac gactacatcg agaaaaggga 480
ccgtgtgctt gcaagtaaag tcgccaggt cttctaggcg ttcaatgagc catacataca 540
taaccctggg gttgtacact gtattatgat cgttcgtgat cttcaaagac cctctgatca 600
gagaaatcac aaatattctt ttgttctatt attgtcatta tcactacccc ttttgtcaaa 660
accagtgcag cctttt 676

```

<210> 26

<211> 1059

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.

<223> PCR marker Tsp509I

<400> 26

```

gcgagatcat gaacttgatt ttctggttgc catattgggc ttgcttggtta accttgtaga 60
gaaggatagc cttaataggt aagtcctca catgcttct tccatttgct caattcatat 120
cagtgttact gttctggcag ttccctgggg tcaggactca gaaacatcca attaattgtc 180
atgttctctt aacgactcag aaatacttta taacctctcc acagggtacg gctttcatct 240
gcccgtgttc ctgttgatct atctcagaat ccacagagtg aagagacaca gagagatgtc 300
atagcactcc tctgttctgt attcttagca agtcaagggt ctagtgaagc ttctggaact 360
atatcaccgg taattcaaaa ttcttcaagt tccttttgta tgtagattat atctttgtaa 420
aactcggeat ttattacctg ctctttgttt caaaaagcag tattttattt tgctccttag 480
cataggtcag cagaacagtt gatcttattc agaaaacaat attttgcag taacatactg 540
ttatctatga gatgaaaatt aatgcatgtg taataatgtc aatgataaat atttgctatc 600

```

tgaatccagt ctaccaactc tagttagacc gaattactga ggttctatTTT caaagaataa 660  
 tttagtgcac catttggtca actactatga agtaaaatgg tttcccttc tattgacatc 720  
 gggttagaag tgaaaggcca tcttaatgcg atgttctcaa tgccacaaac ccacaaatTTT 780  
 cattaacaca tacagattat tattaacata gctataaatt ggatttccag aagcttgagt 840  
 tgaatttatt ttgttacaat tgaaagcact gggaacatta gcattttttt ttagttcttg 900  
 gttattgcaa ttataatgt tatacagaac tgtgtacctc acaatgcatt cattatgaca 960  
 ttctatgaac catttgattg actgttgctt gtaaacaaca ggatgatgag gagtctttga 1020  
 tgcaaggagc acgggaagct gaaatgatga tcgtagagg 1059

<210> 27

<211> 76363

<212> DNA

<213> Orza sativa IR24

<400> 27

gatcaactaa caacctcttt gcagcaaaaa agcatacaca caagtgtttg tcttggcctg 60  
 gggctctgca gatggactga tactctgacc tgcagtgggc ttgggagcta acaatggttt 120  
 cattcttttt ttttttatgt tttccctgt tgtttttgct catgttttgt gtaatttttt 180  
 cttctcatct agcgatgta tttttcttag catgatggga gtagccctcc ttttttttc 240  
 tctaattaag tgtaaagtag caacagcata gggatgaatg ttcagtgtag tgtgtggtgt 300  
 ttcagttatt cagagacgtc catacagttt gtacctgtg accacacgtc ttaatctgat 360  
 gaagcttaga ataaatcaca tgtagcaat gcaatatcat ctgcgtcttc tctcactttg 420  
 gtggccatca aattctgtgt agaagtgtat gggttggtgt ctgttgcaaa tgccgtattc 480  
 cgctctgttt tgtggaagtt aagaagtcct tagttgaaat accgattttt catgatctcg 540  
 gagattgatg caactctgat tgcagcattt ctttttatta gaatgtacac tccatgctat 600  
 catgatgttt attgtttagt actacaagat ttggttaacc attattttta tatcataata 660  
 attttataaa atcttggagt aacaagtca taatacatga tagcataact ttttgaggct 720  
 agtctatgta tattgtctcc ttgttttta aactaagcac tcaataaatt attgatggct 780  
 gtaattttct gaaggtttca ccggtttcgg cccgtgcttt ataaatagct tcggcacaaa 840  
 agacaaaacg gtcctccaa cacataaatg gttgagtta cgttttcatt atcttttgta 900

aaatcaagtc caccacgtag acactcataa caaaagtttg aatatacctca gaaattttga 960  
cttgagtcta tcttaccttt gatatacgagc atccaaccct cctccctcc ctgaacttta 1020  
tattattcat attacacctg aactttatat tattcatatt acaccctgaa gtgggttttca 1080  
tttaattgca tacatgctga aatagtttga caacgtgaga tgcactaaaa atctacacgt 1140  
tcgtcttaag ttgcaattca ttttatccct tttctttttc tctcttacat aggaatatca 1200  
atagtactaa ttcacattac aatatagtat aaattggtaa tcgattattg gcaatatact 1260  
atattaaata ttcaaaacta gtcatttaag ctgccaaata agtaaaccac tatcgaaaac 1320  
cacaatataa atggcattac aaaacttagg gggttgaata tccaatttta aagttcatga 1380  
tgctagagga atttctatca aaagtttatg ggtacatatg gactttttcc tttttaaaag 1440  
aagctattct tgcgtgaaac gttaaatatt ttttgtactt ttttttttat gattgaaaaa 1500  
aaaacttagt tttcaaaatg attgggtctgt atacaagcat caattagact taataaattc 1560  
atctaacagt ttctggcag aaactgtaat ttgtttttgt tattagacta cgtttattat 1620  
ttcaaatatg tgtacgtata tctgatgtga caaccaaac caaaaatttt ccctaactcc 1680  
atgaggcctt acagatatat ttgatgggtg taaagttttt taagttcttt gggtgcaaag 1740  
tttttaaagt atacggacac acatttgaag tattaatat agacaaataa caaacatat 1800  
tacatatctt gcctgtaaac aacgagacaa atttattaag cctaattaat ctgtcattag 1860  
caaacgttta ctgcagcatc acattgtcaa atcatagcgt aattaggctc aaaaatattc 1920  
gtctcgtaat ttacatgcaa actgtgtaat tggttttttt ttcgtcaaca ttttaacttc 1980  
catgcatgtc caaatatttg atgcgatctt tttggccaaa ttttggttga atctaaacaa 2040  
ggatcaaatt tgctgaattt ttccagacgt cacggcttgt tcatccatcg ttgcgcatcg 2100  
gattcgccac cgacgccttg gtttccaacg aattttatca tccgcttaa tacatccaaa 2160  
gtctctccat gccatcggcg gccaacggcg accgctccgc tctaccaat ccacccatcc 2220  
actcgccgcc gccccctgat ccaaagcctc cgccgcgcgc ccgtcgagag gaggaggagg 2280  
aggaggagga ggaggcgtga gcccctatgg ggaccctcct ccggccgcgt ccgcttgccc 2340  
acgccgccgg cgccggcgac gccacgccgt cgaccgcgca cggtagccac gcgcctctcg 2400  
agaggccccc ccccccgcc gctcgtgat ctctcttctc atcctgtttg ggtttgggtt 2460  
tgtgatttgg gtgttttttt tttttccgca gcggtgggtg tgagcggtg ccgcggccgt 2520  
ggcgtggagt gccagccgca tcgggtgcgc cgccgccgg gtccgcaggt tgcggtggcg 2580  
acggcgagct ggaggaggcg gagggagacc gtggtgagat cggatttcgc cgctggtggt 2640

gccgctacca tgggggattc gccgcaggcg ctctcaggtt tgcagcctcc tccactctct 2700  
tctcgcaaaa tgtgttgcta tgttcctctc gctgggctgg cctcatagcc attaatgtag 2760  
tttgctggaa cattacattc ggaacgttgt tggcaattgc ttgacaaaat gtggaattgt 2820  
ggaggggaga aaaatcgttt gaacctgcag tgacaaaatt gccatctata attttaaac 2880  
tgaaggtgtg gaaatcaaac ataatcattg ccagcacatc attcttgta accacctga 2940  
catattgttg gcttataaca gttagctcca caccaacttg gaaggtgtca atggaatgta 3000  
agtataaatt gaggataact ggcagttgtt aagactttct acagaacttg tagcagctaa 3060  
aactagctat tgtgcattta tgtttcatgg aatttgagcg gcaatggata tttcttacta 3120  
agacgtataa tgcaaaaaaa aaaaaaaaaac tatgtctatg cagtttacat gtaatgtgcg 3180  
gatgcaaata aaatcatgtt catggacaaa ctaatgggat tcataccaaa ttccagaatt 3240  
gcatttctta tgtggttact tttgtttgtt gatttggtta ccagacatcg atgtggtttc 3300  
aagggtcaga ggggtttgct tctacgcggt gactgcagtt gcagcaatct ttttgtttgt 3360  
cgccatgggt gtggttcac cacttggtgt cctatttgac cgataccgga ggagagctca 3420  
gcactacatt gcaaagattt gggcaactct gacaatttcc atgttctaca agcttgacgt 3480  
cgagggaatg gagaacctgc caccgaatag tagccctgct gtctatgttg cgaaccatca 3540  
gagtttcttg gatatactata cccttctaac tctaggaagg tgtttcaagt ttataagcaa 3600  
gacaagtata tttatgttcc caattattgg atgggcaatg tatctcttag gagtaattcc 3660  
tttgccggcg atggacagca ggagccagct ggtatggctg tagtctcatc cctgctttct 3720  
taagtagaca tatatacatt tacagtattt ggtaaataaa caagatttta tgaatcatat 3780  
atgatttttg ggaaaacaca aaactctctt tgttggctgc cttgaacata gttctgttca 3840  
cacagttata gcaccttctt taaaatgaag aactttgttg catacacata aggccaaacc 3900  
acataatgaa ttttgtttat ttctatcttt gaatgttagc atcgtttttg tttaatgcat 3960  
gatgccttc ctatataatt gtagtatgtc aacattgtat tccatgctga gcataacaaa 4020  
tggtttgtta aaattcagga ctgtcttaaa cgggtgtgtg atttggtgaa aaaaggagca 4080  
tctgtatttt tctttccaga ggggactaga agcaaagatg gaaagctagg tgcatttaag 4140  
gttcagtaac caaacttagg ttacattaca tctaatagaga tttttatatt cagtatataa 4200  
tgttaacctt ctcatgggtg actgacgtgg ttataaatgt ccccagagag gtgcattcag 4260  
tgtggctaca aagaccggtg ctctgtgat acctattact cttctcggga cagggaaact 4320  
gatgccttct ggaatggaag gcacccctaa ttcaggttca gtaaagctca ttattcacca 4380

tccaattgaa gggaatgatg ctgagaaatt atgttctgaa gcaaggaagg tgatagctga 4440  
cactcttatt ctaaaccggtt atggagtgcg ctaaagaaag atgggtgtttt tttttattat 4500  
atggaacctt ttcaaaggca cagacaggct ttcaaggcta agcttggttac aggtactgat 4560  
actagttact aattactttc gtaatcagta taaataagct tgtgtagtgt aatggcattg 4620  
tacatttctg cacttggtta atttacagaa gaggcaagta atattttaga ggattgagtt 4680  
tattcaccca gtcatatagt tgaagaggca agtaacctgt aagagaggac tgaacattaa 4740  
cacctcttgt tcgattaaaa atgaccaaag agcatcaaac atgtattcga ggctgttact 4800  
ttagatatgg cccattaatt tgttttagtt tctatgtaca tcctagttgg tgtaaatgcc 4860  
agttaccatt tctatgatct aaaacaatca actcttttag tatattttca aaaacgaaat 4920  
tcagtacaca tgtatgaatc ttaatatctt tctctagctc gttacaaaag caacaaaggc 4980  
accgtgtcag ctggttcaca ttagctagtt tgtacttagc attatccact agcaccttat 5040  
tttcatgcat atcatgctaa tttgcttgcc cacgttgagt gggaattttt ttcattgtttt 5100  
ataatttata tatgttttag acttctagtc cacaatttat gtacttcatg ttcctgagcc 5160  
tctagtatgg ctgatagcag actagggtgt gagtgctgtc cttttttgca gactgaagag 5220  
agaagaaata caagactgtc cattgttagt cagatttgta aaaatagact ctgatgtagt 5280  
ttacttttgc ccctatttta tttttaacaa tacaatatata taacagatcc taagaactta 5340  
tcttaattta ggagaagttg ctctgttcat taaattaaat tgtgaagtaa aaatgtgtgc 5400  
tcgagtctgt caatgcaatc ctgtgttctt gtttgaagat atgggtgtagg gcaggccagg 5460  
attgaacact gaatggtaag actgcttctg ccttcagacg ttattgctaa atttttagct 5520  
acttgcagtt agtgctgccg cgccgattaa gcagtagaac aaagtagttt tgtcgtgcac 5580  
aaatgagtta tatttcattg gaaatcgaag cgaaaacgaa tcaaaagtta gaagaaaagg 5640  
ggaaacttgg taattactcc ataaagagag tgcattttat tggttaagatg gtatccggaa 5700  
gctgtgagct ccgggctgta tgtattctgg caaatttgat atgagatgct cgattattgg 5760  
cttaagttag cgatatcaaa tttggggaag caccaaagga attattgtga aggagttagt 5820  
ggtgcgtgac gttatctgct aggttcaaact ccttgtggct atgaatattt atctgctagg 5880  
ttcaaactct agtgactatg aatattaatg ggtaaggtaa gggatttatt gtttaattta 5940  
gtttctttta gattgtgccg tcggacgccg ttcggtaact gtaataatgc tttgtattgg 6000  
attcacttgt gttacatgca cgcactaaac atgtgcttta ctttttcacg tgtttttgcg 6060  
ttctgggcta gaaactcaaa cgttgaattt tccatggctt gctcaacttg acaattactg 6120

cgtgtcaagc gatcttatac gcatactatg cgcacaagtg attgtatacg gatatgatga 6180  
cagtataacg tgtgatattg atttttttta taaaaaaatg atgttcattt ccttgatgaa 6240  
ggaacaaaga ctttttttta aagaagggtg ttactaaaaa caaaaatgac aaaaacaaaa 6300  
tatcagtgc catggcaagt gtgctcggca attttttctc tgtactttaa aaaaaatac 6360  
ttctatatgt tcttttttat aagggtggca caaatctttt aaatgagcca aatatctaca 6420  
ttggatttat taaaaactgt ataaattata atttatactc tgaaagggtg tgtgcatctc 6480  
tcttgagaa aatgtataag ttgcaaaca acattaatcc acgttatgta actttttttc 6540  
gccggaaagg ccgaaggagg cctgacggag cgtggggctc ctcaccggga gaccgcgcag 6600  
gcccccttt gccggttcgg ccggggactc agggtgaaat tctaagctct ctgtatgtgg 6660  
aaggttcgcg accgtcgaaa gagcataaga cacgggcgat gtatacaggt tcgggccgct 6720  
gagaagcgta ataccctact cctgtgtttt gggggatctg tgtatgaagg agctacaaag 6780  
tatgagccag cctctccctt gttctgggtt ccgaatctgg aaaagtccag tccagtcccc 6840  
cctcctaagt gggcaaggtc ctccttttat atcttaaggg gataccacat gcaccatctc 6900  
cctcctttct gtggagactt accctacctt ttcataaatg gacggagatt tgtatagtgt 6960  
ccgtccgaat gaccttctga taggacggcc catacctacc tccacttccg ccgaaagcag 7020  
gtgcgacgtg ggattatggc tgtctgctga cgacatgacc agtgtcagac tggtcacaaa 7080  
ttgctcattc ctgtccacca cgcgtcagtt tagcaatcta catgttggcc cttcttcaca 7140  
caacatcttg cctgtaatgg ttaggatgaa gcctggcata tatctaacca ggactaacgt 7200  
gccatctcta ggaggttaaca cgctagctcc agctggggac gagcgcctag aagccctcgt 7260  
cctgacggga tggggcgagg cgtgcgtcag atcgccctgtc gccacctaac ctgcgatctg 7320  
accggtctgt gactggtcac agaccggata aacgagtga ctgcacttcg ttacatgcag 7380  
cgtgacacgc tcagccaaac cgcaataaat gtgggttaggt gagccccgct gtgctcacct 7440  
aaccataca cgcggagcaa aaaccacga ggggtcgggg cgcctcggcc ctcggggccg 7500  
aggcgggtgc ggtccgaccc cctcgggggg actaagagga gggcgaacac atcacctcgt 7560  
ggcccgcagt ccccgaggg tgccaggcca cgtgggcgat tgtgtctgcc tcaaacctct 7620  
agtcatgata ctctgatcc catgtcaccg acagtagccc ccggcgttat gccagggcga 7680  
tcgccctctt taagggaagc ggtcgggcgt gacgccactc ctaaggcctg gtgacaggtg 7740  
ggaccggtct ccacaattgg gcagaaaccc aacggtcaca aatcacgcac atcggaatg 7800  
gtaactctac tatcaataat gagcgggtctc ttcaagactg ccacattact cgagtagcac 7860

acgaatctgg acatggcgat tcgtttcgtc tggagatatg gtaacgtcgc tttggtcggc 7920  
gagcgtaatt aacgcgcgca cgatatgacg tatctcgact gccacaaccg catatccacc 7980  
tcatgcgccg caagcgggcg aatgggatta gtggaagcgt gggcgcgaga aacgaggggg 8040  
cgaaatagtg ggcgcgagaa gcgaggagcc gggcacagcg ttggcaagag tataaaggca 8100  
ctgaggaaag gatctgtttc ctctctttcg ccatcatttc ccttgtcttc gccgcttgcg 8160  
ccctaactcc ttctttcctg tgctctactt tcgccacacg cgctcgctct caatcttctc 8220  
ttctccggc gccatggcac ggggctccgc tctgctcgat ggtagcgtgc tgccgccttc 8280  
ccgcatcgtg agcgagaggc aggctgggct gccgcgccgc ttcatgccgg aatctgccac 8340  
cggccgggag atagtcacgc tgggcgaggg acgcccggcg ccagactacc cggggcggtc 8400  
cgtcttcttt ctcccccttg caatggcagg gctgggtccg ccattttctt ctttcttcat 8460  
ggatgttctg aagttctacg atctccagat ggcgcacctc accccaacg cggtagtgac 8520  
attggccatc ttgcgcacg tgtgcgagat gttcattggg gtgcgcccat ctcttcggct 8580  
gttccggtagg ttcttcaccg tgcagtcggt gtcgccgcca tcggtagttg gtggctgcta 8640  
cttccagcca cgggggcccgg tgctgaatcg ctacatcccc tgcgccctcc gcaagaagtg 8700  
ggacgactgg aagagcgact gggtctacac cccctcgcg gacgaagcgc gcctccgact 8760  
tccgagccag ccccccggcg aggcctccag ctggcgggcg ccggtagatc tgggggatgg 8820  
ctatgacgcc gtcctcgacc gcctggcggg cctacgatcc caggggctca cagggacat 8880  
ggtgtacggc gactacctcc gtcgtcggat tgcgccgctc cagcggcgcg ctccggggcg 8940  
ctgggagtag accgggtccg aagactacat gaggaccac cagggagtca gatgggactg 9000  
ggctcctgag gatttcaaga tagtgggtcca acgggtgctg aatctcaact ccatggaggc 9060  
gtccctcatt cccaaggaa tcctccctct ctgcagcgat ccagaccgcg cctccatcct 9120  
gaccattatg acggcggctg gggcctcaga ggagtgaact ccaaagggcc acgacggcg 9180  
aggcgggagc cgtagggggg atcaatctac ccggggaggg ggtcgtgctt ctgggtctcg 9240  
cgacggaggc ccgaggagca gccgccctgc cgacgcccg gggaagagga agcagggagg 9300  
aacacctccc ccatctctc cccgaggggg cggggcggtg cgtgccagca gcaggcgccc 9360  
ggagggggcc gcgccgacat cgcagcccga gggggagcgc aagaagaagc ggctccgcaa 9420  
gatgggggag acagaacat ctgaggaaa ccttatttcc cctctaaagt ggtcgtttaa 9480  
ccgacccccct cgcaggttcg tctctcacc atcgtggctg tattcattct ctcaacgcga 9540  
gttttctact acccatcttg ttctgttctt ggtcttttct tctgtttcag cgagatccc 9600

tcgcgtccct cccgccattc caagtccggc cagtctgagg ccgaggatcc ggcggccgca 9660  
gaggcccgga ggcgggaatc tgaccggcga gaggccgcgg atcgccctacg ggaagccgag 9720  
gaggccgccc aggaggccgc ccgggctcgc caggctcagg aaaccgctcg ggaggaggcc 9780  
gcccggggccc gccaggccga ggaagccgct cgggaggagg ccgcccgagc ccaccaggcc 9840  
gaggaagccg ctccgggagaa agccggattt cgccaggacg aggcaatggc gacttccgag 9900  
gcagctcgcg atgaggctcg gggcgcgctcg cttgagccca cttcctcggg cgacgctcag 9960  
gcgacaactt ccgggggcagc tggcgacgag gctgcggggc cgtcgccttg gccactccc 10020  
tcaggcgacg cccaggacca accaggctcc agggacatcc ctgagtccgg cacttccatc 10080  
ggcggccccga gccgcgtggc atcctctcca aggcggctct tccccacgcc ttctatcgcc 10140  
ccactgagcg cagagcccct tctgcaggcc ttggccgccc caaacaccgc ggtgttggaac 10200  
gggcttagtg cccagggtga ggccctgcaa gcagagtggg cggagctcga cgccgcgtgg 10260  
gcgcatgtcg aggaggggcg gcgctcagtg gaggccatgg tggaggtggg ccgcaaggca 10320  
caccgccggc atgtctcgga gcttgaagcc cgtaagaagg tgttggcgga aatcgccaag 10380  
gaagtggagg aggagcgggg ggctgccctc attgccacca gcgtgatgaa cgaggcgag 10440  
gacaccctcc gccttcaata cgggagctgg gaggcgagc tagggaaaaa gctcgacacc 10500  
gcccaggggg tgcttgacgc tgccgctgcc cgagaacagc gggcggggga gaccgaagcg 10560  
gcgtcccagc ggcgcgaaga gacccttgag gcgcgcgcca tggcgctgga agagcgcgcc 10620  
tgcgtcgtgg agagggatct ggcggaccgc gaggccgccc tccactatccg ggaggcaaca 10680  
ctggcgggcg acgagtccgc ctgtgccgaa gaggagtccg cactccgcct ccacaggac 10740  
gcgctcaccg agcgggagcg agctctcgag gaggccgagg ccgcggcgca acggctggcg 10800  
gacagcctgt cctccgcga ggcagcgag gaggagcagg cgcgccgcac tctggaatgt 10860  
gtccgcgccc agaggaccgc actgaaccag caggccgctg acctcgaggc gcgggagaag 10920  
gagctggagc cgagggcgcg cagcgacggg gcggctgcgg gcgaaaacga cttagccgcc 10980  
cgctcgtctg ctgccgaaca taccatcgcc gatctgcagg gcgcgctaaa ctcgctcgcc 11040  
ggggaggctc aggccctccg cttggcaggc gaggtagggc ccggcatgct ttgggacgcc 11100  
gtctcccgcc tagatcgcg cggtcggcag gtgggcctct ggagagggag gaccgtaaag 11160  
tacgccgcca accatggagg cctcgcccag cgctctcga agatggccag ggctctccaa 11220  
cggctccccg aggagctcga gaagacaatt aagtcacct cgagggacct cgcccaagga 11280  
gcggtggagc tcgtactggc gagttaccag gccagggacc ccaatttctc tccatggatg 11340



gcgctggatg agttccctcc tgggaccgag gacagcgcg cgcgagggtcc gggatgccgc 11400  
cgaccatata gtccacagct tcgagggctc agccccctcg ctcgcgttcg cccccaactc 11460  
cgacgaggag gacaatgccg gtggtgcaga cgacagtgc gatgaggccg gcgacccggg 11520  
cgtatcggat tgatccccc agcccccgcc attctttagt tttttcttct tttccttctt 11580  
ctaaggcctt cgggcctctt ttttgtatag atcaacttaa tctgtaatca aaaatgaaga 11640  
aatttttgtg tcaatttcat cttgctgtgt gtatgagatg aggatgatct gtgacgtggt 11700  
ccttttgctt cttagcttga ttaagggctc gtgcccaggt ccagtcctc aaaaggcgtg 11760  
ggtcggggct agtgcctggg gagatccaca tgtcgagact ggccaggccg ggaacgtggt 11820  
gaccgagggt tatgggtgac ccgattgtgg gtttttgccg attcccccc ggagttcacc 11880  
acgccccggg gcacggctcg gttctgggcc ccgtttggcg atttttagccg acccgagccc 11940  
ccgagggcag gattgagcac gagtgcacta tttcaagtca agattcttca aaaggaaaaa 12000  
aaaacacaga tacagccttt aggaaattga aactgctttt attgaaatac tgaaataaga 12060  
gaaataagaa tgtgcatgtg tggcagcccc cggccaacgc tgcacgcccg aggggggtgcg 12120  
gggttggccc gagcccga aa cctgacaccc gacccccccc tcaggggtag aagcgacgaa 12180  
ggtgttcgat gttccacggg ttaggcagct caatgccgtc gcccggtggc agccgtatgg 12240  
agccccggcc ggggacgccg accactcgat acggaccctc ccacattggt gagagcttgc 12300  
tcaatccagc acgcgttttg acgcggcgta ggacgaggtc gtcgacgcag agtgatcggg 12360  
cccggacgtg acgtgatgg tagcgccgca ggctctgctg gtagcgcgcg gctctgaggg 12420  
ccgcgcgccg ctttcgctct tccaagtagt cgaggtcctc tctgcgaagt tgatcttgat 12480  
cagcctcgca gtacatggtg gcccgaggag acctcagggt gagctcggat gggagaaccg 12540  
cttcgcgcc gtagacgagg aagaaaggcg tttccccggt tgctcggctt ggtgtagttc 12600  
ggtttgccca gagcaccgct agcaactcct cgatccatga atcgctgtgc ttcttgagta 12660  
tgttgaaggt cttggtttta aggcctttga ggatttctga attggcgcg tccacttggc 12720  
cattgcttct ggggtgggca ggtgaggcga agcagagctt gatgcccatg tcttcgcagt 12780  
agtcgccgaa gagttcacta gtgaattggg tgccattatc cgtaataata cggttaggca 12840  
ctccaaaccg ggccgtgatg cccttaatga atttaagtgc ggagtgccta tcgatcttga 12900  
cgaccggata agcctcgggc cacttagtga acttgctgat cgcgacatac agataactca 12960  
acccgcccgg ggcccgccca aacgggtccca ggatatcgag cccctagaca gcaaattggc 13020  
acgaaagtgg tatggtctgc agggcctggg ccggctgatg gatttgcttg gcgtggaatt 13080

gacacgctct acatcgccgg accaggtcga cgcgcatcatt gagagctgtc ggccaataga 13140  
aaccctggcg aaaagcttta ccaaccaagg tgcgcgaggc ggagtgggct cgcattcgc 13200  
cttcatggat atcggcaaga agcacaacgc cttgttcccg aggaatgcac ttcaggagga 13260  
ttccattagc cgcgcgccga tagagggtcc cttctaccag cacgtagcgt ttggagatgc 13320  
gatggacgcg ttcactccct tcgcggtcct cgggtaaagt cttatctgtg aggtatgctt 13380  
ggatctcggc aatccaagca atcaatctaa gggagctggg agcgcctccc tcgggtcccg 13440  
aggcctggac ttcgacgggc ctgcgggggc ggtcaggcgc gtccgtctcc cctaagggtt 13500  
cgggtcgcgc cgacggctgg gcaagccttt cttcaaaggc gcccgggtggg gtctgggctc 13560  
gcgtggacgc gagccgtgag agttcgtcgg caatcatgtt atcccgtctg ggcacatgcc 13620  
gaagctcaat cccgtcaaaa tggcgctcca tacgccgtac ttggcgcacg taggcgtcca 13680  
tctgcgggtc agagcaccgg tactccttac agacttggtt aacgaccagc tgggagtcgc 13740  
ctaacaccag gaggcggcgg atccccagtc cagctgccac tctgagtccg gcaaggagtc 13800  
cctcgtactc tgccatattg ttagtcgtc gaaagtcgag gcggaccaag tatctgagga 13860  
cgtctccgct cggagaggtc aacgtgaccc cgcgaccggc gccctgaaga gacagggagc 13920  
cgtcgaactg cattaccagc tgggcgggtg gaggcagctg cgaggggtcc gtgctggcct 13980  
cggggattga gacgggctcg ggagccgggg tccactctgc cacaaaatcg gcgagagcct 14040  
ggctcttgat agcgtgacgt ggttcaaagt gcaaatcgaa ctcaaaaagt tcgattgccc 14100  
atttcaccac ccgtcctgta ccctctcgat tatgcaagat ttgaccgagg gggtaagacg 14160  
taaccacagt gaccgatgc gcctggaaat aatggcgcag tttcctcgag gccatcagaa 14220  
tagcgtaaag catcttctgg gcctgagggt atcgggtttt ggcgtcccgg agggcctcac 14280  
taacaaagta gacgggccgc tgcaccttc ggtggggccg atcctcttcg ctaggggccg 14340  
catccctggg gcaactcttc tccaagcagc ctgcgggggc gcaactgtct tctgtgtga 14400  
tgacctcggg gtcggaggat aacagggggc gccttccac agtggctttg gggccgtcct 14460  
gggggtcagg ggctcctggc gtcgtcggac aagcgggcaa agggccaact ccggctcgtca 14520  
ggggccttag gcctccgttc ggctcggggg cctcttctcc ctgctcttc cgggtcgag 14580  
tcagcacagg gttagcctcg ggggtcaaagg gcgataggtg cggccttccc acagtggcct 14640  
cagggccttc ctgggggtcg ggggctccta gcaccgtctg acaagcgggc agagggccaa 14700  
ctccggtcgt cgggggcctc aggccaccgt tcggctcggg ggccctctct ccctgctctc 14760  
tcccgggcca agtcggcaca ggggtggggaa gcgcgaaatg agaattatcc tcatcgct 14820

ccacaaccaa tgccgcacta actacttgcg gggtcgccgc taagtagagt agcaagggt 14880  
cgtctggctc cggggcgacc ataactgggg gagagcttag atacgccttc aactgggtga 14940  
gggcattttc agcttccttc gtccaggtaa acggtccgga gcgtttgaga agcttaaata 15000  
agggtaacgc cttctctccc agcctcgata tgaaccgact tagggcggcc atgcaaccgg 15060  
tgacgtattg cacatcccta agtttgctgg ggggcgcac cgtcttatag cccgtatctt 15120  
ctcgggggtg gcctcaatgc cccgggcaga gaccaagaac ccgagaagct tgcccgcagg 15180  
tacaccgaac acacacttat cgggggttaa ttttatgcgg gcggagcgga gactctcaaa 15240  
agtttccgct agatctatga gtaacgtttc ctggttgccg gtctttacaa ccaagtcac 15300  
gacataagcc tcaatattac gtcctaattg gctaccgaaa gaaattcgag tagtacgttg 15360  
aaaagtagga cctgcattct ttaacccgaa gggcattgtc gtataacaat aggttcctat 15420  
gggggtaatg aacgcagttt tttcctcacc ctccctagcc atgcgaatct gatggtaacc 15480  
agagtatgca tctagaaaac acaaaaggtc gcaccccgca gtggagtcga caatctgac 15540  
tatgcgaggc agggggtaag gatccttagg acatgccttg ttaaggtcgg tgtagtcgat 15600  
gcacatccga agcttgccgt tcgccttggg aacgaccacc gggttcgcca gccactcggc 15660  
gggggttgac ctgccatcat atttttcggc gatgggtggc cggaacctg ggggccaacg 15720  
gacattccga agactcgcca caaaggctct acagccgaca ccaccaaccg ggggcacgga 15780  
gggctgattc ccgcgtccgt gttgaggatga cactctggac gaggaagcgc cctccgttgc 15840  
gtgggcagca cttcggtcat tacgccggcg ctgatgctg gtgcgggcgt ccggcccccc 15900  
acgcagatct ttctgggtcg aaggagtcga cgaaggagt gcggccgaat ggcgaacagc 15960  
ggctgccgtc cgtcgtgccc tccgtcttga cgacgcggag ccggtggtag cagcaccaga 16020  
ggccttggtg gcggaggacc gccaccagc atctaggcgc tgccgtgccg tcatgactaa 16080  
tttggccacg tcgtccagcc atcgttgggc tggagactcc gggtcaggga cgacaggcgg 16140  
gtgacgtaag agcgcgcccc cagcttgag cgcgccctgg ggcgtgctgc cgtcgccgta 16200  
gacgaggagg cgacgtccc catctcgccg ttcttctcca tcgcccgcga tcggtgaagt 16260  
cgcggatctt tcgacctct cgagcgcctc cccccgctta ggactttggc atggaggag 16320  
cgggtggagta cgagctcgac ggcgtgggtt cggtccccg tcgtcgccac tcacactcgg 16380  
agagaggctg tgcgcctttg cttgctcggc catcaggctg aacaggaaaa gcttggcgca 16440  
cacggaagag tacgagagct cagaaaaaca cacactgagt cccctacctg gcgcgccaga 16500  
tgacggagcg tggggctcct caccgggaga ccgcgcaggc ccccctttgc cggttcggcc 16560

ggggactcaa ggtgaaattc taagctctct gtatgtggaa ggtttgcgac cgtcgaaaga 16620  
gcataagaca cgggcgatgt atacagggtc gggccgctga gaagcgtaat accctactcc 16680  
tgtgttttgg gggatctgtg tatgaaggag ctacaaagta tgagccagcc tctcccttgt 16740  
tctgggttcc gaatctggaa aagtccagtc cagtccagtc cccccctcta agtgggcaag 16800  
gtcctccttt tatatcttaa ggggatacca catgcaccat ctcctcctt tctgtggaga 16860  
cttaccctat cttttcataa atggacggag atttgtatag ttgccgtccg aatgaccttc 16920  
tgataggacg gcccatacct acctccactt ccgccgaaag caggtgcgac gtgggattat 16980  
ggctgtctgc tgacgacatg accagtgtca gactggtcac aaattgctca ttcctgtcca 17040  
ccacgcgtca gtttagcaat ctacatgttg gcccttcttc acacaacatc ttgcctgtaa 17100  
tggttaggat gaagcctggc atatatctaa ccaggactaa cgtgccatct ctaggaggta 17160  
acacgctagc tccagctggg gacgagcgcc tagaaacct cgtcctgacg ggatggggcg 17220  
aggcgtgcgt cagatcgctt gtcgccacct aaccgcgat ctgaccggtc tgtgactggt 17280  
cacagaccgg ataaacgagt gcactgcact tcgttacatg cggcgtgaca cgctcagcca 17340  
aaccacaata aatgtgggta ggtgagcccc gctgtgctca cctaaccat acacgcggag 17400  
caaaaacca cgaggggtcg gggcgccctc gccctcgggg ccgaggcggg tgcggtccga 17460  
ccccctcggg gggactaaga ggagggcgaa cacatcaccc tcgggcccga cgtccccga 17520  
gggtgccagg ccacgtgggc gattgtgtct gcctcaaacc tctagtcatg atactcctga 17580  
tcccatgtca ccgacaaggc catccgaatg tattaaggag taaaagttac aagaaaaaac 17640  
accataatgc accaatgtgc atgaccacac accatacact accccaagc acaaaccact 17700  
gagggtgaag cctagcacca aacgaccgcc actaagtgtg accaaacgcc gctaggccta 17760  
cggcagcaac acatagatga gacttcgaaa acgatgccac caaggtggtc acgacatcta 17820  
ggatgctgcc atcgtccatc taaaaagatg tggttttcac ccagagaaac tcatcaagaa 17880  
ggggagaggg taacccttga cagcgcccca aggagggttac gacgcccga ggcgtagccg 17940  
ctgccggtcc ggtgaaccac cggactaggtc ttccgcctag gaccctatag ccttgatcgc 18000  
agatcacctg ccaccactca gaaccaccac acagacaaaa ggtagcacgt agcttccacc 18060  
acaccgcacc gacgcccctt cgtcggccga ctccatcgaa ccaccatccc tgagagctgg 18120  
cccaggaccc ctccgttcca ccaccgcgg gccgccttgc cagttttggc caaaggagaa 18180  
cccgggactg ggtgacattg cttcggcagc ctgagcttcc cccgctggcg agctgctgtc 18240  
tcaatccaac ctagaaactc cccgcaaaag aaggggatga gctctaggaa gggcgagggt 18300

gccgaccggc aacgaggaag acaacccatc gactccagct ccctttgcac taccatctgg 18360  
ccctgcgcca atgccggata cgctgtcgtc cgggtccgg cgccacccac ctgcaccccc 18420  
tttgcctggc ctccgcgccc ctcttggtct cgctgcgccc ccagctggc cgctaagggc 18480  
accgcgacgg ccgcccggct accgaggcct ggccgcgcca tgggacagct cgcgctggca 18540  
ccagcgagcc acggccgtcg cgctgttgcc ggccgagcg agcacaaccg ccagctccaa 18600  
gggccgagca tgccactgag ccgcccggc tgccgcccgg gccggctgca cgtcacccgg 18660  
gcacacgacc gacgcccggc acgctccggc tccgcgcccg aggcagcccc atgccattgc 18720  
cgcgcacctc gcccgcccgc tgccgagccg ccaccgcgca ccttgctgag ccgccaccgc 18780  
cgtccctagc cgctcgtgc cgccgccacg ccagatccag gcgcgggatg gccggatccg 18840  
gccttggggg cgccggatcc accgcctccc cacaccgcca cggcgtcacc acctccgacc 18900  
gcagtgaggg ctctcgtggt tgcccatcc tcatcgctc gaggaggaag acgccaagaa 18960  
aaaagggcct cgccgctgcc ttccttgctc gctgccggct tcgccccgg cgagctccgg 19020  
cggcggcgag gtgggggaga agaagtggg agtgggcagc tagggttttt tcgccccca 19080  
agccgcccgt gcgagagcga cgggtggggg gggggggact ttccaacctc ttccagtgtt 19140  
ctagttctcc acgttatgta actcaatttg tttaaccata gaaagtaaga aacctaccag 19200  
cgtgttaagc tctctttcat tccctttctt ctctctggtt ttgcttccat cacatgtcaa 19260  
gtgaagggtt cttactacc attactcta cacatcta ttttttctca gatctttcgc 19320  
aggtatatat tgatgtaca ttttatgat ttaagataat ctcttcaca ttacctctg 19380  
ctgaaacttt agcttgaacc gtcacttca ccacaatttg agcccaattt gcacagagca 19440  
caacgagcaa tagcttgccc ttacgttcat tatttagcat gaactactac taactacca 19500  
agaatcaata caccggttta ataacgcat tttatcacgt taatatatgt ttcatcaca 19560  
acaccggttt tggcacagtt gcaaacttgc aataaattct ttcctacttc tccatcccat 19620  
aatataacaa attggtatgt ctctctggt actaagttac tatattatga gatggaggga 19680  
gcacttcttt tcttccaaaa tataagaata tagtattgga ttagatatta tctagattca 19740  
cgaattcgat taggttgtct agatttatag ttgtatgtaa tgtataattc ggtaataggt 19800  
tattacctct caggatggag ggagtagttt tgactttttt tttcttataa atcgctttga 19860  
tttttatatt agtcaaattt tatcgagttt aactaagttt atagaaaaaa attagcaaca 19920  
tttaagcacc aactagttt cattaaattt agcatggaat atattttgat aatatatttg 19980  
ttctgtgtta aaaatgctgc tatatttttc tataaacgta gtcaaattta aataagttag 20040

actaaaaaaaa atcaaaacga cttataatat gaaatggagg aagtagtaga ctataacaaa 20100  
tttaaaccgt gctttgattt tagagcatca ctaatatgtt agcaataatc tatccctaaa 20160  
atltattttt ttctctaaac tgaaaatagg aagtggaaat actcctccat ctaagagaga 20220  
gcctaaattc aataaaaaac taaaaaacta aaggtggatc cctctattaa actaccgcaa 20280  
aaaatttatg ttttttttct cttccacgcg cgcagaacag atatctcgat caagttagca 20340  
tgtaaaattt ttaaagagat accttatacg actccttccg tatttccaaa agcaaacgga 20400  
tttaaaatct gactcaaata aagatctata tatccaattt acatgacaca tgtttcgccc 20460  
aatttttata ttaataataa ttaatatatt taaaattaaa ttattagcaa tttgtttgga 20520  
ggatttatca aaacaggatg gacgttggtt ataacagcgt ctagacctag acgcgcttgc 20580  
aaactgcggc caccctttta tcacacaaat ttttgacaat ttgacacttt ccaaaaatta 20640  
atltttataa ttaaccgtga ccaaaactta tttaaaaatg atctttttgt tgagcgcaaa 20700  
atcgtatact tcagcgccaa atagcacggc gccgacctcc cccttcccct cccctctatc 20760  
ctccactgct gccgcccacc tctccgtatc agctgcgtcg cgttggtttc cgccggcgct 20820  
gctgctgctg caccagtccg ctagggcggg cgggcatggc gcgccgcgcc gcttcccgcg 20880  
tccgcgccgg cgctgttgge gcccttcgct cggaggggctc gacccaaggg cgagggggcc 20940  
gcacgggggg cagtggcgcc gaggacgcac gccacgtgtt cgacgaattg ctccggcggtg 21000  
gcagggggcg ctcgatctac ggcttgaact gcgccctcgc cgacgtcgcg cgtcacagcc 21060  
ccgcggccgc cgtgtcccgc tacaaccgca tggcccagagc cggcgccgac gaggttaactc 21120  
ccaacttgtg cacctacggc attctcatcg gttcctgctg ctgcgcgggc cgcttgacc 21180  
tcggtttcgc ggccttgggc aatgtcatta agaagggatt tagagtggat gccatcgctt 21240  
tactcctct gctcaagggc ctctgtgctg acaagaggac gagcgacgca atggacatag 21300  
tgctccgcag aatgaccag cttggctgca taccaaatgt cttctcctac aatattcttc 21360  
tcaaggggct gtgtgatgag aacagaagcc aagaagctct cgagctgctc caaatgatgc 21420  
ctgatgatgg aggtgactgc ccacctgatg tgggtgtcgt taccactgtc atcaatggct 21480  
tcttcaagga gggggatctg gacaaagctt acggtacata ccatgaaatg ctggaccggg 21540  
ggattttacc aaatgttggt acctacaact ctattattgc tgcgttatgc aaggctcaag 21600  
ctatggacaa agccatggag gtacttacca gcatggttaa gaatggtgtc atgcctaatt 21660  
gcaggacgta taatagtatc gtgcatgggt attgctcttc agggcagccg aaagaggcta 21720  
ttggatttct caaaaagatg cacagtgatg gtgtcgaacc agatgttggt acttataact 21780

cgctcatgga ttatctttgc aagaacggaa gatgcacgga agctagaaag atgttcgatt 21840  
ctatgaccaa gaggggccta aagcctgaaa ttactaccta tggtagcctg cttcaggggt 21900  
atgctaccaa aggagccctt gttgagatgc atgggtctctt ggatttgatg gtacgaaacg 21960  
gtatccaccc taatcattat gttttcagca ttctaatatg tgcatacgct aaacaaggga 22020  
aagtagatca ggcaatgctt gtgttcagca aaatgaggca gcaaggattg aatccggata 22080  
cagtgaccta tggaacagtt ataggcatac tttgcaagtc aggcagagta gaagatgcta 22140  
tgcgttattt tgagcagatg atcgatgaaa gactaagccc tggcaacatt gtttataact 22200  
ccctaattca tagtctctgt atctttgaca aatgggacaa ggctaaagag ttaattcttg 22260  
aaatgttgga tcgaggcatc tgtctggaca ctattttctt taattcaata attgacagtc 22320  
attgcaaaga agggagggtt atagaatctg aaaaactctt tgacctgatg gtacgtattg 22380  
gtgtgaagcc caatatcatt acgtacagta ctctcatcga tggatattgc ttggcaggt 22440  
agatggatga agcaacgaag ttacttgcca gcatggtctc agttggaatg aaacctgatt 22500  
gtgttacata taatactttg attaatggct actgtaaaat tagcaggatg gaagatgcgt 22560  
tagttctttt tagggagatg gagagcagtg gtgttagtcc tgatattatt acgtataata 22620  
taattctgca aggtttattt caaaccagaa gaactgctgc tgcaaaagaa ctctatgtcg 22680  
ggattaccga aagtggaacg cagcttgaac ttagcacata caacataatc cttcatgggc 22740  
tttgcaaaaa caatctcact gacgaggcac ttcgaatgtt tcagaacct 22800  
atttacagct ggagactagg acttttaaca ttatgattgg tgcattgctt aaagttggca 22860  
gaaatgatga agccaaggat ttgtttgcag ctctctcggc taacggttta gtgccagatg 22920  
ttaggacct 22980  
atgatctatt tctttcaatg gaggagaatg gctgtactgc caactcccgc atgctaaatt 23040  
ccattgtag gaaactgtta cagaggggtg atataaccag ggctggcact tacctgttca 23100  
tgattgatga gaagcacttc tccctcgaag catccactgc ttccttgttt ttagatcttt 23160  
tgtctggggg aaaatatcaa gaatatcata ggtttctccc tgaaaaatat aagtccttta 23220  
tagaatcttt gagctgctga agccttttgc agctttgaaa ttctgtgttg gagttctttt 23280  
ctcctacagt cgtattagag gagggatctt ctctttatgt gttaaatacg aggtatgtat 23340  
gtcacctctc cgaattattt ttactctggt tcctagacgg taaacaagca attatgttct 23400  
gcctttgatg ccagaaaaaa cacaaaagtt tgtcgttatc tctactaacg gatcataaag 23460  
gaatttgtaa ctggagtttc aaacttaatt tgtctaggca gtagttttgg cattagatcc 23520

aacattgtgt aggattcatt tgttgtgtatc aatctatagg gtttcattaa atttcgttta 23580  
tgtgtactgt ttaggtgttg aatagtttga cttgtttttt aactgaacaa aagatactga 23640  
aatcgttcca ttcaacaaac acatgttccg ttaatgaaat tattgtacgt taccttttgt 23700  
tttcttactc acaagtgtcc tcttttctta taccctatag attggtacaa caaattattg 23760  
attcaatttt ggttttgaac attgatgatc ctccctgcac tattggtgca gctgctcttc 23820  
tattcatttt gtgaagtgat gtgagtacct ctcaatccca tccttatgct tctgtgcatg 23880  
cttcattcca attttttacg catatcgatt gttttctttt atataacagt ccataaagat 23940  
aatcacatca tgacaaagtt atttatttct acagtatagt tatataagta ttcaccagtt 24000  
ttccatgaat attttggcat gtgattacaa agaagattat ttgagaaaat ccatgctttt 24060  
atttcatcat tttgtttgaa gttgaacttt aatttatggt gttaaatttca gttattattg 24120  
ctagcagctc gtactcttta atggtataac ttcacttggt cttattctcc aatatctccc 24180  
ttcttgttgt tcaggttcaa gaaaatcatt tgttggattc agaatctggt gtccattttc 24240  
ttcttaaatt attaaatcct ccagtgaatc ttgttgattc caaagcacca tcgatagggt 24300  
ccaaacttct tggaatcagt aaagttcaaa tgcttaatgg atcaaataag gattctgact 24360  
gcatttcaga ggaaatcett tcaaaagttg aagagattct ctttaagctgt caagtgatca 24420  
agtcgctcga caaagatgac aagaaaacaa caaggccaga actgtgtcca aagtggcttg 24480  
ctttgttgac aatggaaaat gcatgcttgt ctgctgtttc agtagagggt aagttttaat 24540  
caaatttctt ggtcattgatt tccctttatg accattatat ttatttatat gagccaaata 24600  
agcagttgtc aacttgtcat aagttacata gcacctatth gcaatattca tgggtggttt 24660  
gcttagccct tttcttcacc tgcttttgat tgatgacttc catctgtgtt gcagaattga 24720  
attggagtag tggactgcac tagaagcacc tatggccatt gtcatactag gaaggttttc 24780  
ccttatcaaa tatttgattg ttacagagac ttctgacaca gtgtccagag ttggaggaaa 24840  
ttttaagag acattaaggg agatgggagg tcttgatagt atttttgacg ttatggtgga 24900  
ttttcattca acattggaga tgagatctcg ctaacatcgc atattttaca tttcctttgt 24960  
tcaactctaa tagattgtgc aggcttggtc cttttcgcca ttttagcttt aatgcgcttg 25020  
aagccacatg aaagtaatgc ttgtccagat acatagccaa aggttggttat attttggggc 25080  
atggaaaatg cttgaggtag taactattht catcaggaca tggaaaattg gctgcaacac 25140  
aaattatgtt gttttatgtt gcaaaaatag ttttttaata cttttttatt ctgcatgtgg 25200  
tgttagtatc ttacagtcc tctgatgatt atatcccca cgataataac acttgaaacg 25260



ataataacac ttgacatatc tacaccaagt gaacattatt catttgatg ttacttttcc 25320  
agctatactt gctgttcttg catgtgtaag caagtttgga gtaaattgcg cattaattta 25380  
aatgcttggt gttcctatct gtgtactttt tattcccaa ctaataatgc aatcatatta 25440  
cgctgataaa ctgaataaat aaattaacaa tatacttctg gtggcaaacc ttgtgtatca 25500  
gaatctcata aaggatacat ccacttcagc tttggaccga aatgaaggaa catctttgca 25560  
aagtgtgct ctcctcttga aatgtttgaa aatattggaa aatgccatat ttctaagcga 25620  
tgataacaag gtaatgctcc ttatatgttc tgtttcagtt tagtaccat ttccttcttc 25680  
tgtactatct tctctcctga tttgttctgt gcaaaatgtg caaacagtgc gactttgtat 25740  
gtctgcttaa caattttctt ttcttcctga aaaagcaata tgaactctta cattcatttt 25800  
gcttcttgca gaccatttg cttaatatga gtagaaaatt gaacccgaaa cgctccttgc 25860  
tttcttttgt tgggtgtcatt atcaatacta ttgagttatt atcaggtatt tttcttaata 25920  
atacaatgtg ttcgctaaca caataaaatg ttttaaacat ccagtatgtt aaagttgcag 25980  
tctgacgct attttgtttt gctgcagctc tttcaatact tcagaattct tctgttggtt 26040  
ccagctctac atatccgaaa tegtctaaag tctctcaaca gagttactct ggtaataaca 26100  
aacaccaatt ttgtttgate agttgatctc gttggctttt ctatgcactg tctcaatata 26160  
gtttggctgc cattcaagtc tctactacaga tgttgaactt ggctgacac caaatattta 26220  
taaaatgcta cctgatattt ttaatatctc atgtttcctg acccagatta tcttggtggt 26280  
tcctcgtata agtttaatta gtgacattct tgaagctttg ttatgcagca gatgtcatgg 26340  
ggggaacttc atttaatgat ggaaagagca agaactcgaa aaaaaaaaaac ttttgtcgaa 26400  
ccagacacgt cattgttget tatcttcaa atcagaagtt tctcatatta ctatatcttc 26460  
tggtagtgat gctggctctgt cacagaaggc attcaattgt tctccattta tatcaagcaa 26520  
tggggcatca agtgggtcat taggcgagag gcacagcaat ggtagtggtt tgaagttgaa 26580  
tataaaaaag gatcgtggca atgcaaatec aattagaggc tcaactggat ggatttcaat 26640  
aagagcgcac agttctgatg ggaactccag agaaatggca aaaagactcc gtctatctta 26700  
aaatgtaatc accgacagtg gtgggtggtga tgaccctttt gcatttgacc gccgcgtcgg 26760  
cgtcgccacc acgtaatcgc ccacgtcgtt gccccgctg ccacgtcgtc gaccgcgcac 26820  
ggtaatcaca cgcactctga ggccgccgt agctgatata ttctcatccg gttgatttgt 26880  
gattttggcg tttttgcagt ggtgatggcg gggggcgacc gtggccgagg cgtggagtgc 26940  
catccgcac agggtgtatc ggccgcgtg ctccgccctg gtccgcaggc tttggcggcg 27000

agctggcggc ggagggagac tgtggtgaga tcggatttcg ccgctggtgg tgtecgctacc 27060  
atgggggatt cgccgcaggc gctctcaggt ttgcagcctc ctccactctc ttcccttttt 27120  
tatttttttt tctcgcaaaa tgtgttgtga tgttcgtctc gctgggctgg cctcatagcc 27180  
attaatgtag tttgctggaa catttacatt tggaacgttg ttggcaattg ctttacaaaa 27240  
tgtggaattg tggaggggag aaaaatcatt tgaacctgca gtgacaaaat tgccatctct 27300  
aattttaaaa ctgaagggtg ggaaatcaaa cataatcatt gccagcgcat cattcttggt 27360  
aaccaccatg atatatgtt ggttataaca gtttagctcca caccaacctt gaagggtgtca 27420  
atagaatgtt tagtataaat tgaggagaac aggcagttgt taagactttc taaagaactt 27480  
gtagcagcta atactagcta ttgtgcattt gtgtttcatg gaatttgagc agcaatggat 27540  
atttcttact aagatgtatg atgcaaaaca aaaaactatg tctatacagt ttacatgtaa 27600  
tgtgcggatg caaataaaat catgtacatg gacaaactca tgggattcat accgaattcc 27660  
agaattgcat ttcttatgtg gttacttttg ttgttgattt ggttaccaga catcgatgtg 27720  
atttcaaggg tcagaggggt ttgcttctac gcggtggctg cagttgcagc aatctttttg 27780  
tttgtcgcca tggttgtggt tcatccactt gtgctcctat ttgaccgata ccggaggaga 27840  
gttcaggaaa aaaatttgaa aatacccatt ttttgaaaaa gatttacgtt tatatacact 27900  
agtatgaaga atttgcgaaa atataactaa tccgcagatc ggttatgcgg gagcgcaaca 27960  
aaagtatggc gtggcggcgc ggagtggacg gccgaggcgt tcgcgcggaa tggggctgcg 28020  
ggaccgagcc agtctcgctt gccggtaacg cggaaccggt acgctcccgc agcgccagtg 28080  
tgcggaaccg cggcgccaac atttttttac tgcatggcac tgtgtttaat actgtttgac 28140  
actgtttctg gtactgtttt acacagttcc cgggtcagtt ccgcacaatg gaggcgcggc 28200  
accgaccatg aacaatgtgt gaacagtgtt gcacagggtt aaaacagtgt ataaactgcg 28260  
ctgcacagtg ctggagtcgc tgccactgc ggttccgcgt tttggaaccg cgggaccgtc 28320  
gcgattccgc gttttggagc tgccggacca tgacggttcc gcgcaggatc gtcgggtccc 28380  
tattttgaat ctgcggaacc gtcgctgtcc cgcgtttcca tttcgcgga tgcgatatatt 28440  
tttataaaac ctctccatgc atgtatataa acataaatta ttgaaaaaat aagtatattt 28500  
gcaaattttt ttcgagagct cagcactaca ttgcaaagat ttgggcaact ctgacaattt 28560  
ccatgttcta caagcttgac gtcgaggga tggagaacct gccaccgaat agtagccctg 28620  
ctatctatgt tgcgaaccat cagagttttt tggatatcta tacccttcta actctaggaa 28680  
ggtgtttcaa gtttataagc aagacaagta tatttatgtt ccgaattatt tgatgggcaa 28740

tgtatctctt aggagtaatt cctttgcggc gtatggacag caggagccag ctggtatggc 28800  
tgtagtctca tccctgcttt ctttaagtaga catatatgca attacagaat ttggttaaaca 28860  
aacaagattt tatgaatcat atatgatttt ggggaaaaca ccaaactctc tttggtggct 28920  
gccttgaaca tagttctatt cacacagtta tagcaccttc tttaaaatga agaactttgt 28980  
tgcatacaca tatggccaaa ccacataatg aattttgttt atttctatct ttgaatgtta 29040  
gcaccttatt ttcatgcata tcatgctaatt ttgcttgccc acgttgagtg ggaatttttt 29100  
tccatgtttt ataatttata tatgttctag acttctagtc cacaatttat ctacttcatg 29160  
ttcctgagcc tctagtatgg ctggtagcag actaggtgct gagtgctgtc catttttgca 29220  
gactgaagag aggagaaata caggactgtc cgttgttagt cagatttgta aaaatagact 29280  
ctgatgtagt ttatttttagc ccctatttta tatttaacaa tacaatatata taacgtatcc 29340  
taagaactta tcgtaattta ggagaagttg ctcgtttcat taaattaaac tgtgaagtaa 29400  
aatgtgtgc tcgagtctgt caatgcaatc ctgtgttctt gtttgaagat atggtgtagg 29460  
gcaggctagg atcgaacact gaatggtaag actgcttctg ccttcatttg tgcacttgg 29520  
gctgccacgc cgattaagca gtagaacaaa gtaattttgt cgtgcacaaa tgagttatat 29580  
ttcattgaaa atcgaagtga aatgaacca aaagatagaa gaaaagggga aacttggtta 29640  
ttatatactc cacaaattta ttggttaagat ttgatattag acgctcgatt acttggtta 29700  
agttaaggat atcaaatttg gggaagcacc aaaggaatta ttgtgaagga gttgtgggtg 29760  
cataacgtta tctactagtt caaatcctag tgactatgaa tattaatgag taaggtaagg 29820  
gatttattgt taatttttagt ttctttaaga ttgtgtccga gtacaccatt cggttaagtgt 29880  
aataatgttt tgtattggat tcacttgtgt tacgtgcatg tgcttttacc ttttcatttg 29940  
tttctgcgtt ctgggtatga atttgacgag attccatggt cagctcaaca tatcagttac 30000  
tgcgtgtcaa gcgatcttat atggtatgcg cacaagcgat tgtatacgga tatgacagta 30060  
taatgtgtga tattgatacg atgttccttt cctttataaa ggaacaaaga ctttttttaa 30120  
aaaaagaagg ggtattacta aaaacaaaaa tgtcaaaaac aaaatatcag tgcacatggc 30180  
aagtgtgcac gagcaatagc ttgcccttac gttcattatt tagcatgtac tactactaac 30240  
tacgcaaaaa tcaattcacc gattattaaa ctgttaacat catttttagca cgttaacata 30300  
tgtttcattc aacacaccgg ttttggcaca tttaaaaact tgcaaagttg caatactccc 30360  
ttcgttacat agcataagag attttaggtg aatgtgacac atctatccaa attcattata 30420  
ctagaatgta tcaccgcctc cacgccggga gggagagcgc cgccggtgga gaaaggggga 30480

gggagtggtc gaggggaacc agtaggggtgc cctccccgtc gccgcctccc cgtggccgcg 30540  
ccggcgagac aggaggaaga gggggagatg gagcggcgcc gccggtgagg gcgcgcgtgc 30600  
gcgggggggg ggggggggga gcggcgacgc cgggtaggaa gggaagggga gtggtggctt 30660  
tgagagagat aggggagagg gaaaatgatt ttagagttag ggtttgggct gctgagtttt 30720  
tatatagatc gggatcaatc aggaccgtcc atcagatcgg acaactacgg tttctcccgc 30780  
gttgggcccgg gtgccactcc taggttgccc acactattgg gccacatgta cgctccgcgt 30840  
gaaataagtt cacttttaggt cctttaagtt gcctctgaat tgttcccagg ccggccgcac 30900  
tattgggcca ccccataggc catgtgtacg ctccgcacag aataatttcg ctttagctcc 30960  
cttaatttgt cccctcaaac ttctaaaacc agtgcaaate tttaattttt agttcaccca 31020  
ttgcaactca cgggcatatt tgctagtgac atataatatg aaacgaagga tgtagcagac 31080  
tatagaatth aaactgtgct ttcatttttag agcatcacta actgttattt agatttttat 31140  
ttaaataaat gcagaaatga tgtttttatt atgaaaatta gcaataaagc tcccaaaatt 31200  
tcaaaaaaaaa attaaaagag atttattaat catggttaat ttaattaaaa attaaatcta 31260  
accatatcat attatttcac ggtccgtgat gaggaaatgg cagctgctat cacttatggt 31320  
gggagagaag gggcattggt tatttttata actatctctt ataactcca tgaaactata 31380  
aaataaatat aatcattatc ataacattag tttttttcca ttgcaacgca agggtaatth 31440  
ttcagtacaa taaaaaaata aaagtgggcc attctgaacg gaaatttctg gttttttttc 31500  
ccaagagcgc cgcacacaac tgcgcaagag atcgatcgcg atcacctgc tcgtcgccga 31560  
tctcctacac catccctgcc atctccttcc cctccactgg ctgctgctgc acctgtcagc 31620  
tagggcgggc atggcgcgcc gcgcgcgttc ccgcgctgct ggcgcccttc gctcggaggg 31680  
ctcgatccaa gggcgagggg gccgcgcggg gggcagtggc ggtggcgcgg aggacgcacg 31740  
ccacgtgttc gacgaattgc tccgtcgtgg cataccagat gtctttctct acaatattct 31800  
tctcaacggg ctgtgtgatg agaacagaag ccaagaagct ctcgagctac tgcacataat 31860  
ggctgatgat ggaggtgact gccacactga tgtggtgtcg tacagcaccg tcatcaatgg 31920  
cttcttcaag gagggggatc tggacaaaac ttacagtaca tacaatgaaa tgcttgacca 31980  
gaggatttcg ccaaattgtg tgacctacaa ctctattatt gctgcgctat gcaaggctca 32040  
aactgtggac aaggccatgg aggtacttac caccatggtt aagagtgggt tcatgcctga 32100  
ttgcatgaca tataatagta ttgtgcatgg gttttgctct tcagggcagc cgaaagaggc 32160  
tattgtatth ctcaaaaaga tgcgcagtga tgggtgtcgaa ccagatgttg ttacttataa 32220

ctcgctcatg gattatcttt gcaagaacgg aagatgcacg gaagcaagaa agatttttga 32280  
ttctatgacc aagaggggcc taaagcctga aattactacc tatggtaccc tgcttcaggg 32340  
gtatgctacc aaaggagccc ttgttgagat gcatggtctc ttggatttga tggtagcaaa 32400  
cggatatccac cctaatacatt atgttttcag cattctagta tgtgcatacg cttaaacaaga 32460  
gaaagtagaa gaggcaatgc ttgtgttcag caaatgagg cagcaaggat tgaatccgaa 32520  
tgcagtgcag tatggagcag ttataggcat actttgcaag tcaggcagag tagaagatgc 32580  
tatgctttat tttagcaga tgatcgatga aggactaagc cctggcaaca ttgtttataa 32640  
ctccctaatt catggtttgt gcacctgtaa caaatgggag agagctgaag agttaattct 32700  
tgaaatgttg gatcgaggca tctgtctgaa cactattttc tttaattcaa taattgacag 32760  
tcattgcaaa gaaggaggagg ttatagaatc tgaaaaactc tttagacctga tggtagctat 32820  
tgggtgtgaag cccgatatca ttacgtacag tactctcatc gatggatatt gcttggcagg 32880  
taagatggat gaagcaacga agttacttgc cagcatggtc tcagttggaa tgaaacctga 32940  
ttgtgttaca tatagtactt tgattaatgg ctactgtaaa attagcagga tgaaagatgc 33000  
gttagttctt tttagggaga tggagagcag tgggtgttagt cctgatatta ttacgtataa 33060  
tataattctg caaggtttat ttcaaaccag aagaactgct gctgcaaaag aactctatgt 33120  
cgggattacc aaaagtggaa ggcagcttga acttagcaca tacaacataa tccttcatgg 33180  
actttgcaaa aacaaactca ctgatgatgc acttcggatg tttcagaacc tatgtttgat 33240  
ggatttgaag cttgaggcta ggactttcaa cattatgatt gatgcattgc ttaaagttgg 33300  
cagaaatgat gaagccaagg atttgtttgt tgctttctcg tctaacggtt tagtgccgaa 33360  
ttattggacg tacaggttga tggctgaaaa tattatagga caggggttgc tagaagaatt 33420  
ggatcaactc tttctttcaa tggaggacaa tggctgtact gttgactctg gcatgctaaa 33480  
tttcattgtt agggaactgt tgcagagagg tgagataacc agggctggca cttaccttc 33540  
catgattgat gagaagcact tttccctcga agcatccact gcttccttgt ttatagatct 33600  
tttgtctggg ggaaaatatc aagaatatca tagatttctc cctgaaaaat acaagtcctt 33660  
tatagaatct ttgagctgct gaagcatttt gcagctttga aattctgtgt tggaattctt 33720  
ttctcctaca gtccgattag aggagggatc ttctctgtat gtgtaaatag cgaggatatgt 33780  
atgtcacctc tccgaattat tttagactgtg gttcctggac tgtaaacaag ctattatctt 33840  
ctggtgttga tgccagaaaa aacacaaaag tttgtcgta tctctactaa cggatcataa 33900  
aggggtttgt aactggagtt tcaaacttaa ggtatctagg cagtaggtat atattgatcc 33960

tacatcttat gatcttaaga tgatatcctt ctcattatcc tctgctgaaa ctttagcttg 34020  
aacggtcatc tacaccacaa tttgagcccc ttagcacaga gcacaacgag caatagcttg 34080  
cccttacgtt cattatcttag catgcactac tactaactac ccaataatca atacatcggt 34140  
tattaaactg tttgtacagt ttaataatgt cattttatca cgttaacata tgtttcattc 34200  
aacaccacac cggttttggc acagttgcaa acttgcaata acattttttac tacttctccg 34260  
ccccataata taacaatctc gttccatact atattgctat attacaggat ggatgaagta 34320  
cttcttttct tccaaaatat aagaatctag tactagatta gatattatct ggattcacga 34380  
atttgattag gctgtctaga tttgtagtcg tatgtaatgt ctaattcggg aataggttat 34440  
tacctctttg gatggaggga gtagttttta tttcgtactc cctccgtttc atattataag 34500  
ttgttttgac ttttttctta gtcaaatctt attgagtttg attaaattta tagaaaaaaa 34560  
ttagcaacat ttaagcacca cattagtttc attaaatgta gcatggaata tattttttata 34620  
atatgtttgt tttttattaa aatgctacta tatttttcta taaatgtagt caaatttaaa 34680  
gaagtttgat tatgaaaaaa tcaaaatgac atataatatg aaactgagga tgtagcagac 34740  
tatagcaaat ttaaactatg cttttatctt agagcatcac caaaagatta gcaataatct 34800  
atccctaaaa ttcaagtttt gggtttctta aactgaaaat aggaagtga aaatcttttc 34860  
cgtccaagag atagcctaaa tcttatctta actaattaaa atattcataa ttttcctttc 34920  
gtcacattaa attttcgtcc gtaaactctga ttgaaatcca attggacaat ccaaaaaata 34980  
gagaaaaaga acagaaaaaa taataaaaag cacacaaatc ttatctcaat cccgcgggaa 35040  
gctgccgacg ccgccgaatc cgctcgagcg ccgccgccgc cgctcacggg gaacgatgtc 35100  
gctgctgtcg cacgcggtat gggaggggcg cgctgccact gcttgggaga taggatatgg 35160  
agagagaagg aatgtgagg gttagggtta ggtttttccc cgtccgtatc ttcagcgaca 35220  
cggaggcgat ccaagctgtc catcagatcg gacggctcag aatgcctcca tcgtcgggcc 35280  
gcgcatgctt gatgggcca gggaaggccg gagggctcga caaacgcaat caaaggagga 35340  
gttggaggag gtaaattaga atttatctgc gggctgagat agtaaatgga ctgaaaatgg 35400  
cccatagaga aattgggaat tttattttaa taaatgttga aaagggtgtt atattatcaa 35460  
aattaaaaat taagctccga aaattctaaa aaatattcaa agagcattat taatcatggt 35520  
taatttaata aaaattaaat ccaaccatat catattatct cacggcgcgcg gtaggaaaa 35580  
tgcgagctg ttgtcgctta cgggtgggaga gaaggacat tgtttatttc cagaactatc 35640  
ttttataact cccatggaac tttaaaataa atataatcat tattatagca ttagtttttt 35700

tctgtctttt ttttcccaa gagcgccgcg cagaagagat cgatecgcat ctccctgccc 35760  
cgacgtcgcc ggccgatctc tcattctctc cagccctgc tcgtcgccga tctcctacac 35820  
catccctgcc atctctctct tcccctcccc tctatcctcc actggtgccg cccacctctc 35880  
cgtataagac aaactgcggt gcggcgttgg tttccgccgg cgtgctgct gcacctgtca 35940  
gctagggcag gcatggcgcg ccgcgccgct tcccgcgctg ttggcgccct tcgctcggac 36000  
ggctcgatcc aagggcgagg aggcgcgcg gggggcagtg gcgccgagga cgcacgccac 36060  
gtgttcgagg aattgctccg gcgtggcagg ggcgcctcga tctacggctt gaaccgcgcc 36120  
ctcgccgacg tcgcgcgtca cagccccgcg gccgcctgtt cccgctacaa ccgcatggcc 36180  
cgagccggcg ccggcaaggt aactcccacc gtgcacacct atggcattct catcggttgc 36240  
tgctgccgcg cgggcccgtt ggacctcggt ttgcggcct tgggcaatgt cgtcaagaag 36300  
ggatttagag tggaagccat cacccttact cctctgctca agggcctctg tgccgacaag 36360  
aggacgagcg acgcaatgga catagtgtc cgcagaatga ccgagctcag ctgcatgcca 36420  
gatgttttct cctgcacat tcttctcaag ggtctgtgtg atgagaacag aagccaagaa 36480  
gctctcgagc tgctgcacat gatggctgat gatcgaggag gaggtagcgc acctgatgtg 36540  
gtgtcgtata ccaactgtcat caatggcttc ttcaaagagg gggattcaga caaagcttac 36600  
agtacatacc atgaaatgct tgatcgagg atttcaccag atgttgtgac ttacagctct 36660  
attattgctg cgttatgcaa ggggtcaagct atggacaaag ccatggaggt acttaccacg 36720  
atggttaaga atggtgtcat gcctaattgc atgacatata atagtattct gcatggatat 36780  
tgctcttcag agcagccgaa agaggctatt ggatttctca aaaagatgcg cagtgatgg 36840  
gtcgaaccag atgttgttac ttataactcg ctcatggatt atctttgcaa gaacggaaga 36900  
tccaccgaag ctagaaagat ttttgattct atgaccaaga ggggcctaga gcctgatatt 36960  
gctacctatt gtacctgtct tcaggggtat gctaccaaag gagcccttgt tgagatgcat 37020  
gctctcttgg atttgatgg acgaaacggc atccaccctg atcatcatgt attcaacatt 37080  
ctaatatgtg catacgctaa acaagagaaa gtagatgagg caatgcttgt attcagcaaa 37140  
atgaggcagc atggattgaa tccgaatgta gtgacgtatg gagcagttat aggcatactt 37200  
tgcaagtcag gcagtgtaga cgatgctatg ctttatittg agcagatgat cgatgaagga 37260  
ctaacccta acattattgt gtatacctcc ctaattcata gtctctgtat ctttgacaaa 37320  
tgggacaagg ctgaagagtt aattcttgaa atgttggatc gaggcactct tctgaacact 37380  
attttcttta attcaataat tcacagtcac tgcaaagaag ggagggttat agaacttgaa 37440

aaactctttg acctgatggt acgtattggt gtgaagccca atgtcattac gtacagtact 37500  
ctcatcgatg gatattgctt ggcaggtaag atggatgaag caacgaagtt actctccagc 37560  
atgttctcag ttggaatgaa acctgattgt gttacatata atactttgat taatggctac 37620  
tgtagagtta gcaggatgga tgacgcatta gctcttttca aagagatggt gagcagtggg 37680  
gtagtccta atattattac gtataacata attctgcaag gtttatttca taccagaaga 37740  
actgctgctg caaaagaact ctatgtcggg attacaaaa gtggaacgca gcttgaactt 37800  
agcacataca acataatcct tcatgggctt tgcaaaaaca atctcactga cgaggcactt 37860  
cgaatgtttc agaacctatg tttgacggat ttacagctgg agactaggac ttttaacatt 37920  
atgattggtg cattgcttaa agttggcaga aatgatgaag ccaaggattt gtttgcagct 37980  
ctctcggcta acggttttagt gccagatggt aggacctaca gtttaatggc agaaaatcct 38040  
atagagcagg ggttgctaga agaattggat gatctatttc tttcaatgga ggagaatggc 38100  
tgtactgcca actcccgcct gctaaattcc attgttagga aactgttaca gaggggtgat 38160  
ataaccaggg ctggcactta cctttccatg attgatgaga agcacttttc cctcgaagca 38220  
tccactgctt ccttggtata gatcttttgt ctgggggaaa atatcaagaa tatcatagat 38280  
ttctccctga aaaatacaag tcctttatag aatctttgag ctgctgaagc attttgcagc 38340  
tttgaaattc tgtgttgga tttctttctc ctacagtccg attagaggag ggatcttctc 38400  
tgtatgtgta aatagcgagg tatgtatgtc acctctccga attattttga ctgtggttcc 38460  
tggactgtaa acaagctatt atcttctggt gttgatgcca gaaaaaacac aaaagtttgt 38520  
cgttatctct actaacggat cataaagggg tttgtaactg gagtttcaa ctttaaggtat 38580  
ctaggcagta gttttgacat tagatccaac attgtgtagt attcatttgt gtgtatcaat 38640  
ctatagggtt tcattaaatt tcatttgtgt actgtttagg tgttgaatat attgttttac 38700  
ttgtttttta actgaacaaa agatagctga agctttgttc tttaccaa atgcagtagtga 38760  
tcatcacaat atattttttt acggaacagg agattgtata aaatggtttc catcggcggc 38820  
caacggcgac cgctctgctc tgaccaccca cccaatccat ccatccactc gccgccgcc 38880  
ctgatccaag cctccgccgc gcgacagcga cgcaccgccg tcgagaggag gaggcgtgag 38940  
ccccatgggg accctcctcc ggccgcgtaa tgccgctgca cggtaaccac gcgcctctcg 39000  
aggcctccgc cgctagctga tctcttctca tcctgtttgg gtttgggttt gtgatttggg 39060  
tgttttttcc gcagcgggtg tggtggtggt gggtgcggcg ggagggggcg gtggccgcgg 39120  
ccgtggcgtg gagtgccagc tgcacgggt gcaccgccgc cgggggtccgc aggttgtggt 39180



ggcgacggcg agctgaggag gcggagggag actggtgagg gacacaggca ggcaggctct 39240  
caaggctaag cttgtttacag gtactgagac tagttactaa ttactttgat aatcagtata 39300  
aataagcttg tgtagtgtaa tggcattgtg catttctgca cttgtaaatt ttacagaaga 39360  
tggtcattca atttgaacct gcatctaata ttttagtggt ttgagtttat tctcccagtc 39420  
acagagttga agaggcaagt aacctgtaag agaggactga acattaacac ctcttgttcg 39480  
attaaaaatg accaaagagc atcaaacatg tattcgaggc tgttacttta atatggccca 39540  
ttaatttggt tagttggcta tgtacatcct agttgggtgca gtgttggtgga aaacggaata 39600  
cgggtgtcgg atggacgagg tgccgtcaag cgattaatcg taatacggat gattaaacgg 39660  
aattatatgg atttttggcg ttcgcactaa gatgtacata attgatgta atggcaatgg 39720  
tggagacaaa atgcatcatc ttaataaaaa atatttgtat aaatctctaa ctatattatg 39780  
aaaatgccat ttattagttc aatagatata aacactgatg gttagtagcg caatagcatt 39840  
gggcttggtta gtcaaaatag tgcagctggg ctgcaagttg caagtttatg ttagtttcat 39900  
aaacagacat ctgatttgtc gataaataac cgactaatcg tgccatacaa ctgtataatt 39960  
actctgaaat agtaatgttg ctccgacttg atgatacggg acggtctggc taccgtttcc 40020  
gttttgacag acgattaaac ggctgtgccg gtcgacttcc acaacactga gttgggtgtaa 40080  
atgccagtta ccatttctat gatctaaaat aatcaactct tttagtatat tttcaaaaac 40140  
gaaaattcag tacacatgca tgaatcttaa tcttcatatc tagctcgta caaaatcaac 40200  
aaaggcacccg tgtcagctgg tgcacattag ctagtctgta cttagcatta tccactagca 40260  
ccttattttc atgcatatca tgctaatttg cttgcccacg ttgagtggga atttttttcc 40320  
atgttttata atttatata gttctagact tctacttcat gttcctgagc ctctagtatg 40380  
gctggtagca gactaggtgc tgaatgctgt ccttttttgc agactgaaga gaggagaaat 40440  
acaagactgt ccgttgtag tcagatttgt aaaaatagac actgatgtag tttatttttg 40500  
cccctatttt atatttaaca atacaaatat ataacgtatc ctaagaattt atcgtaattt 40560  
aggagaagtt gctcgtttca ttaaattaaa ttgggaagta aaaatgtgtg ctcgagtatg 40620  
tcaatgcaat cctgtgttct tgtttgaaga tatgggtgtag ggcaggccag gattgaacac 40680  
tgaatggtaa gactgcttct gctttcagac gttattgcta aatttttagc tagttgcaat 40740  
tagtgctgtc acgccgatta agcagtagaa caaagtaatt ttgtcgtgac aaatgagtta 40800  
tatttctttg aaaatcgaag cgaaaacgaa ccaaaagata gaagaaaagg gaaacttggt 40860  
aattactcca caaagagaac aaatttattg gtaagatttg atatgagatg ctcgattact 40920

tggccttaagt taacaatatc aaatttgggg aagcaccaaa agaattattg tgacttaagt 40980  
taaagatatc aaatttgggg aagcaccaaa ggaattattg tgatggagtt gtgggtgcat 41040  
aacgttattt gctttgttca aatcctagtg actatgaata tgaatattaa tgcgtaaggt 41100  
aaggaattta ttgttaattt taggttcttt acgatttgtt cgggggacgc cattcggtaa 41160  
ctgtaataat gttttgtatt ggattcactt gtgttacatg cacgcactaa acatgtgctt 41220  
taccttttca tttgtttgtg cgttctgcgt ttgaatttga cgagattcca tggtcagctc 41280  
aacatgtcag ttactgcgtg tcaagcagtt actgcgtgtc aagcgatctt atatggtatg 41340  
cgcacaagcg attgtatacg gatatgacag tataacgtgt gatattgatt tttttatata 41400  
aaaaaatacg atgttacttt ccttcataaa ggaacaaaga cttttttttt aaaaaaaga 41460  
aggggtatta ctaaaaacaa aaatgtcaaa aacaaaatat cagtgcacat ggcaagtgtg 41520  
ctcggcaatt ttttgtctgt actttaacaa aaaatatctc tatatggtat tttttacaag 41580  
ggtgtcacia atatittaaa ttagccaaac atctgcattt tattaaaaac tgtataaatt 41640  
ataatttata ctctaaaagg ttgtgtacat ctctcttga gaaaatgtat aagttgcgaa 41700  
caaacattaa tccacgttat ataagtcaat ctgttattta accatagaaa gtaagaaacc 41760  
tactagcgtg ttaagctaag ctctctttca ttctctttct tcttcttggg tttgcttcaa 41820  
tcacttgta agtgaagggt tcttaactac cattactcct actcaccaaa tttttttctc 41880  
agatctttcg taggtatata ttgatcctac atcttatgat ctttaagatga tatecttctc 41940  
attatcctct gctgaaactt tagcttgaac cgtcatctac accacaattt gagcccccta 42000  
gcacagagca caacgagcaa tagcttgccc ttacgttcat tatttagcat gcactactac 42060  
taactacca ataatacaata catcggttat taaactgttt gtacagttaa ataatgtcat 42120  
tttatcacgt taacatatgt ttcatccaac accacaccgg ttttggcaca gttgcaaact 42180  
tgcaataaca tttttactac ttctccacce cataatataa caatctcggt ccatactaga 42240  
ttgctatatt acgggacgga tgaagtactt ctttcttcc aaaatataag aatatagtac 42300  
tagattagat attatttgga ttcacgaatt tgattagget atctagattt gtagtcgtac 42360  
gtaatgtcta attcggtaat aggttattac ctctttggat ggaggaggta gtttttattt 42420  
cgtactccct cgttttcata ttataagttg ttttgacttt tttcttagtc aaattttatt 42480  
gagtttgact aaatttatag aaaaaatta gcaacattta agcaccacat tagtttcatt 42540  
aaatgtagca tggaatatat ttttataata tgtttgtttt tttattaaaa tgctactata 42600  
tttttctata aatgtagcca aatttaaaga agtttgatta cgaaaaaaaa tcaaaatgac 42660

atataatatg aaactgagga tgtagcagac tatagcaaat ttaaactatg cttttatattt 42720  
agagcatcac caaaagatta gcaataattt atccctaaaa ttcaagtttt gggtttctta 42780  
aactgaaaat aggaagtga aaatcttttc cgtccaagag atagcctaaa tcttatctta 42840  
actaattaaa atattcataa ttttcctttc gtcacattaa attttcgtcc gtaaattccga 42900  
ttgaaatcca attggacaat ccaaaaaata gagaaaaaga acagaaaaaa taataaaaag 42960  
cacacaaatc ttatctcaat cccgcgggaa gctgccgacg ccgccgaatc cgctcgagcg 43020  
ccgccgccgc cgccgccgct cacggggaac gatgtcgtcg ctgtcgcacg cggtatggga 43080  
gggcgccgcc gccgctgctt gggagatagg atatggagag agaaggaaat gtgagggagg 43140  
gttaggtttt tccccatccg tatcttcagc gacacggagg cgatccaagc tgtccatcag 43200  
atcggacggc tcagaacgcc tccatcgtca ggccgcgcgc gcttgatggg ccgagggaag 43260  
gccggagggt cgaacaaacg cagtcagagg aggagttgga ggaggtaaag tagaatttat 43320  
ttgcgggctg agatagtaaa tggactgaaa atggcccata gagaaattgg gaattttatt 43380  
taaataaatg ttgaaaaggt gtttatatta tcaaaattag aaattaagct ccgaaaattt 43440  
taaaaaatat tcaaagagca ttattaatca tgattaattt aataaaaatt aaatccaacc 43500  
atatcatatt atttcacggc gcacggtagg aaaatgcgca gctgttgtcg ctgacgggtg 43560  
gagagaaggg acattgttta tttccagaac tatcttttat aactcccatg gaactttaaa 43620  
ataaatataa tcattattat agcattagtt tttttctgtc tttttttcc ccaagagcgc 43680  
cgcgacagaag agatcgatcg cgatctccct gccccgacgt cgccggccga tctctcattc 43740  
tctccacgcc ctgctcgtcg ccgatctcct acaccatccc tgccatctcc tccttcccct 43800  
cccctctatc ctccactggg gccgcccacc tctccgtata agacaaactg cgttgcggcg 43860  
ttggtttccg ccggcgctgc tgctgcacct gtcagctagg gcgggcatgg cgcgccgcgc 43920  
cgcttcccgc gctgttgggc cccttcgtc ggacggctcg atccaagggc gaggaggccg 43980  
cgcggggggc agtggcgccg aggacgcacg ccacgtgttc gacgaattgc tccgccgtgg 44040  
caggggcgcc tcgatctacg gcttgaaccg cgccctcgcc gacgtcgcgc gtgacagccc 44100  
cgcggccgcc gtgtcccgt acaaccgcat ggcccagacc ggccgccgacg aggttaactcc 44160  
cgacttgtgc acctacggca ttctcatcgg ttgctgctgc cgcgcggggc gcttggacct 44220  
cggtttcgcg gccttgggca atgtcattaa gaagggattt agagtggacg ccatcgctt 44280  
cactcctctg ctcaagggcc tctgtgccga caagaggacg agcgacgcaa tggacatagt 44340  
gctccgcaga atgaccgagc tcggctgcat accaaatgtc ttctcctaca atattcttct 44400

caaggggctg tgtgatgaga acagaagcca agaagctctc gagctgctgc acatgatggc 44460  
tgatgatcga ggaggaggta gccacactga tgtgggtgctg tataccactg tcatcaatgg 44520  
cttcttcaaa gaggggggatt cagacaaagc ttacagtaca taccatgaaa tgctggaccg 44580  
ggggatttta cctgatgttg tgacctacaa ctctattatt gctgctgtat gcaaggctca 44640  
agctatggac aaagccatgg aggtacttaa caccatgggtt aagaatgggtg tcatgcctga 44700  
ttgcatgaca tataatagta ttctgcatgg atattgctct tcagggcagc cgaaagaggc 44760  
tattggattt ctcaaaaaga tgcgcagtga tgggtgtcgaa ccagatgttg ttacttatag 44820  
cttgctcatg gattatcttt gcaagaacgg aagatgcatg gaagctagaa agattttcga 44880  
ttctatgacc aagagggggcc taaagcctga aattactacc tatggtaccc tgcttcaggg 44940  
gtatgctacc aaaggagccc ttgttgagat gcatggctctc ttggatttga tgggtacgaaa 45000  
cggtatccac cctgatcatt atgttttcag cattctaata tgtgcatacg ctaaacaagg 45060  
gaaagtagat caggcaatgc ttgtgttcag caaatgagg cagcaaggat tgaatccgaa 45120  
tgcagtgacg tatggagcag ttataggcat actttgcaag tcaggcagag tagaagatgc 45180  
tatgctttat tttgagcaga tgatcgatga aggactaagc cctggcaaca ttgtttataa 45240  
ctccctaatt catggtttgt gcacctgtaa caaatgggag agggctgaag agttaattct 45300  
tgaaatgttg gatcgaggca tctgtctgaa cactattttc ttttaattcaa taattgacag 45360  
tcattgcaaa gaaggaggagg ttatagaatc tgaaaaactc tttgagctga tgggtacgtat 45420  
tgggtgtgaag cccaatgtca ttacctacaa tactcttatac aatggatatt gcttggcagg 45480  
taagatggat gaagcaatga agttactttc tggcatggctc tcagttgggt tgaaacctaa 45540  
tactgttact tatagcactt tgattaatgg ctactgcaaa attagtagga tggaagacgc 45600  
gttagttctt ttttaaggaga tggagagcag tgggtgttagt cctgatatta ttacgtataa 45660  
cataattctg caaggtttat ttcaaaccag aagaactgct gctgcaaaaag aactctatgt 45720  
taggattacc gaaagtggaa cgcagattga acttagcaca tacaacataa tccttcattgg 45780  
actttgcaaa aacaaactca ctgatgatgc acttcagatg tttcagaacc tatgtttgat 45840  
ggatttgaag cttgaggcta ggactttcaa cattatgatt gatgcattgc ttaaagttgg 45900  
cagaaatgat gaagccaagg atttggtttgt tgctttctcg tctaacggtt tagtgccgaa 45960  
ttattggacg tacaggttga tggctgaaaa tattatagga caggggttgc tagaagaatt 46020  
ggatcaactc tttctttcaa tggaggacaa tggctgtact gttgactctg gcatgctaaa 46080  
tttcattgtt agggaactgt tgcagagagg tgagataacc agggctggca cttacctttc 46140

catgattgat gagaagcact tttccctcga agcatccact gcttccttgt ttatagatct 46200  
tttgtctggg ggaaaatatc aagaatatta taggtttctc cctgaaaaat acaagtcctt 46260  
tatagaatct ttgagctgct gaagcatttt gcagctttga aattctgtgt tggaattcctt 46320  
ttctcctaca gtcctattag aggagggatc ttctctgtat gtgtaaatag cgaggtatgt 46380  
atgccacctc tccgaattat ttttactgtg gttcctagac tgtaaacaag caattatgtt 46440  
atgctgttga tgccagaaaa aacataaaaag tttgtcgtta tctctactaa cggatcataa 46500  
agggatttgt gactggagtt tcaaacttaa tgtgtctagg cagtaatttt gacattagat 46560  
ccaaaacaat ttatagggtt tcattaaatt tcatctatgt gtactgttta ggtgttgaat 46620  
agtttgactt gttttttaac tgaacaaaag atatgtctga agctttgttc ttaccaaat 46680  
gcagtactga tcatcacaat atatttttta tggaacaaga ttggattgta tagaatgggt 46740  
tctgatctga ttatcttata tcaacgtatt attatgcaca tgtactaatc atgaaatata 46800  
tgatggaatg atgtttctat ttacctgtgt gaggcagcaa ggagtgagat ggataacacc 46860  
acatactccc tctgtcccag aatataagaa gtttttagagt tggacacgat tattaagaaa 46920  
gtaggtagaa gtgagtagtg gagggttgtg attgcatgag tagtggaggt aggtgggaaa 46980  
agtgaatggt ggagggttgt gattgggttg gaagagaatg ttggtagaga agttgttata 47040  
ttttggggag tacattatta ttctagaaca atactgttgt gctcaagaag cgttccaaag 47100  
atgtttcaca acctgtgctc gatgggtttt gagcttaate ctgggacatt cagtatcatg 47160  
atctgtctca ttcttaaaca tggaataaag gatgacagca tgatttcttt gtctctataa 47220  
tcttttgget acccacagat aatagctgta aatctatact actttaaaag gagtagtggt 47280  
ggtggtgagt ggtgaatctg ccaccacccc accaccaact ctcaaaattc tgacatgtgg 47340  
gatcaactgc aatcccttct ccaagacatg tgggatcact gtcaatccct tctccaaacc 47400  
aattgtatga tagaacagtg gaaatcacgg acagaccatg gagctctcaa ccataatcat 47460  
ccttgcgagt taataacaaa tggagcgtaa acttggcaag caaaaaactc aaattaattc 47520  
taaaattaag ctctaggatt caaaatagat ttcctctctg cattgtgctg ttatgatttt 47580  
taattccgta acaacgcaaa tgcattttgc tagtcttata aagaagggtt aatgcaaata 47640  
ttctgattaa atgattgtat ctatgaagtt tgaatgctag tggaagctcc tttgaccatg 47700  
ttttgttgtg cgagcattta agagagtga gagaatgctt ctttgggtgt gttctggtat 47760  
ggaaggatcc acagataaaa ttcaggttct actgcttctc tgcttgtaat tttcatgaag 47820  
ctgcagtga taccttggtg accacttgat ctgttgcttt gaaggagaat atagtagtgg 47880

ccaaggttgg tgacggtgat ggtggcatgt gatccccag atcttcagtg acccagagag 47940  
gaggggacgg cgcgtggtga gctacaaggc atactcagtg gagggcaaga tcaaggcctc 48000  
ccgtccgtag gggactccgc tgcatacaagg ccaactgctc cgaactgacg aatttctggt 48060  
acggatcact tctcctttcc tttttttttt caccttaage actctcttga ttcttcgctg 48120  
ctacctccct taatttcttt caatatattg tggcacttga tcatggcgga gaccacacctt 48180  
ccagtgtgaa tggattttgt caaagaacta aatttattcc attagcttat tttccgatta 48240  
catggaagac attcttttct ggaataaata cagaactaaa tcctgtttcc tgaataaaag 48300  
ttgttagtgt gtggcatggt gcatttccgc gcttctaaat tttataaaac ctgttcattc 48360  
aatttgaacc tgcataccat ccaatatatt aggtgcagac aggtgcttgc ggtagggtta 48420  
aagaagttgg caaaaatgct tctgaagaaa ggttaattgt tgtttcatct caggaggtaa 48480  
tatgcagatg attattccaa ttggcattgc cttgccattt ttatcacgag tctttacaat 48540  
tttatatcct cctacatatt ctttccagat tccagatgat ccagtgtctc caacaattga 48600  
ggcgcttatt ttgctccata gtaaagtaag tacacttget gagaaccacc agttgacaac 48660  
acggcttggt gtaccatcaa acaaagttgg ttgtattctt ggggaaggtg gaaaggtaat 48720  
tactgaaatg agaagacgga ctggggctga aatccgagtc tactcaaaag cagataaacc 48780  
taagtacctg tcttttgatg aggagcttgt gcaggtaatt tatttgcca tacctacacc 48840  
agagatccat atattacttt tataactgca gtttttactt gttaacattt cattgtgctt 48900  
ttacatttgt tccaagcttt cagggttctg ggcttccagc tattgaaaga ggagccctga 48960  
cagagattgc ttcgaggctt tgaactagga cactcagaga tggaagttct tccaataatc 49020  
cgacaccttt tgccccgtt gatggctctc ctgttgatat cttgcctaac aaggaattca 49080  
tgctatatgg acgatctgct aatagtcccc catatggagg gcctgctaata gatccaccat 49140  
atggaagacc tgccattgat ccaccatatg gaagaccaat atccacaata tggaagacct 49200  
gccaatgatc caccatatag aagacctgtc aatgatacat catattgagg gttgaacaat 49260  
gatgggcctc gtgatcaggc ccggtcctga ggggggctga atggggcgat cgctccgggc 49320  
ccccgatc ccaggggccc cacctatctg tgcaacgagt agtagcgatc ttccagcgcg 49380  
caacgtgagg cgatgtttct ccgtgatttc gccggcctgc aactgcgaga tcgcgagtat 49440  
aacgatcagc cgatcgatct catctgccga ctgccatgct gatgccacac gcaagcgag 49500  
catatcagcc ttatcttggt tgatcggcct gctggacgag cacatctggt gtgcgcatcaa 49560  
ctgctgactg ctatatatgt gctgggtgctg aatcgatcga ttgtcgtcac ggaagtgaag 49620

aacaaccacg gcactgctgc ctgctgggct ctagccgcc a tcagtaagta cgctatactg 49680  
cctatctaga tctagatcga gattacatag tggaattatc tgtttataac aaaattacaa 49740  
ggtatcaatt gataatttaa gggtataacc gtacaaactt cagtgatttg ctgggttcac 49800  
attgggttaga tttgtttcaa ctaatttggt acttctgtag ccttgtaatt tacgaatcta 49860  
gtattaatat tttcttaagt attagcctgt tccttgatat tatgctgttg agaaagtatg 49920  
caatagataa caaaaacaag taggtgtgtt gaggatgctc aagagtaata caggcacttc 49980  
aataattctg atattatcag gacatcatca ataattctgc gcctacaaat cttcaaagaa 50040  
aattttaata taatgcgtat gatttttttaa atacgaatat tgattgctat ttaaagatat 50100  
ttatattata tggtaattat tatttgaagg ttataataa aggcctccgt ttttagtttc 50160  
acgctgggcc ttcagaatct caggaccggc cctgctcatg atccttacac cgtgtatcct 50220  
gtagagtact tctctaaaag agagtaccct agtggaagta gcaaagttgc accatctgct 50280  
tcatacgaaa gatatgcagc aactactcgc ttgcctaata gagaactgcc ctcatctatt 50340  
agtcctggtg ccgattatat gtcctgccgt tcttatcttg accaagtacc tactgatagg 50400  
tactctaata gggttacact acaattaggg ctcttgagag ccgggaatag taatgtgcaa 50460  
caattaggaa tcaccagagc tggaaattcc aatgcttatg attatactga ggtacatttc 50520  
caatgcgtta gcttgccctt tctttgcaa tggccctcgc ctgatatggt tccattagaa 50580  
acatgaaacc atatatattga ctgttgcat t atgtctat tcttccatga tgggtcagac 50640  
gtctgaaaaa aggacaaaaa tattctagaa tatgtcatgg tgatccaaat atatccttct 50700  
gtcttgtgcc cactctaata tctatcgttg gtaacactat tcaattgtta ccatgttggt 50760  
gcaaacccta gattcagtta ttcagctggt ctctgctgct gttgcttacc agttttctta 50820  
gttgggtggt gatcttttct catTTTTTat ttccttgttt cctgggtcac ctgctgcctc 50880  
tctgatgcat ctgaatgtat atttttgttc tcttcagtgc ttaatagatt taaatttcat 50940  
tcttttcagg ctgcggagct gatccatgga cgtgaggatt accgaagact gtcaggctctc 51000  
actgggtatg gcttacgcag actgaatttt tacaggacac aaacatgaat tttgtcctca 51060  
taatcattga gtgatgatct ctttgcaggt atccagggtg ctctgtcgaa ttgtggattc 51120  
caaatagtta actggagtct gtcattgggt ttgggtggtg caatctagct gagatccgtc 51180  
tggtatagcg taagagaaac atcatgcact atccccagtc ataaccatgc cccaatggcc 51240  
accaatagtt ttcctcgtga aaatctcccc ttgatcccag atctctggtg cgagagtga 51300  
gttgcacgaa gcccatcctg gttcttccga gtccattgtg gagatccagg gcattccgga 51360

tcaagtgaaa gccgcacaga gccttctgca aggcttcac ggcgcaagca gcaacagcag 51420  
gcaggcgccc cagtcctctc gcatggccca ttatitttag taagctggag gacattcgca 51480  
acaggggggt cagtggtcac tgcaaagctg agtttgttct tcagttcaac tgcagaaaat 51540  
tgcagatcgg ttgccgtagt tgctagaacg gtacatagtt gccacctaac tgtagcgagt 51600  
ggcataactt atttgtgtgt actgcccaat gttgtctctc ctttgtgttca tggattcaga 51660  
cttgtgattg tagtatttct ggatcagact ggagtaaaag aaaaaaaaaa aggaagacat 51720  
gggtttaaca gtaagctcaa aacgttgaca gtagtaaaat aaaaggggtt tgttcacttt 51780  
atttccaata tcaaccttac caacatttgg cgttgaatca ttataccac atcgcttggtg 51840  
cagctgaatt tggggctgtt taaaagatgg tctcttgat tgctaattgc ctcgcggcaa 51900  
gcgtggtacc ttgtacaata taaatataat tataactatt taatttcata attaaacatg 51960  
ttgttacaaa tctctactat tataaaaatt gaagatgttt ttgtccggt ttttggtacg 52020  
tcatctgtgt atgaatccgt ttttaagttc gtttgctttt ggaaatacat atctgtattt 52080  
gattcagttt ataagatcgt tcacttttgg taatacagaa ggaatcatat aagaattctg 52140  
tttaaaaaca ctcgtatagt aacttgagac gatcagacgc ctaactacag ctcattgattt 52200  
tctaaatata tatatatata tatatatata tactagaaaa aatatatgtg tgttaaaagc 52260  
tatcttaatc ttattattgt tatatatattt agttaacaag aaatctattg tgggaacttg 52320  
tttgatata tattttttta aaaaaaatca tgagctgcaa ttaggaatcc aatcgtctca 52380  
agtttagcagg agggcgagtt tttttaaga gatttcttat acgatttctt ctatatttct 52440  
aaaagcaaac gaacttaaaa accgactcaa acatggatct gtatttccaa aaacgaataa 52500  
acttaaaaac cgactcatgc acagatgatt aatttttata atagtagaga taaacgaact 52560  
cccacagtga attttatttt aactgaacca tataacaata ataagattaa aatagacttc 52620  
accggttgca atgcacgggc attttttcta gttaaaagag aaataaaaaa acacaaaaat 52680  
ttataaaatg taaaaaagaa aaatattata attttgtag aattattatt ataatataga 52740  
aaaatagttg ccaaaatttc tcaacgaatg tcgaataaac tcagcaatgt catatattta 52800  
aatatgatgg taatatttgt tcgcaaaact ttaatcttca atccttcaac aacatagata 52860  
tacaacgtcg taatcgccaa caagcccag tgaccataca ggatagccga gcggtggatc 52920  
tgtactgttc ttgggtgaaa taaatctagt acattgtata tcttatctta atatctacta 52980  
ttataaaaaat tgaagatatt tcttcaaaga tttccatacg ttctctactc cgttacaata 53040  
tcggttctac tccgttacaa tatcggtttt gtacaccccg cgcacgcgtt gtgtgttctc 53100



ccgtttccaat acatgaagct agagtcttgc ttctccctgg tctggcaggc cctttttcca 53160  
ccatccccac cagggccagc gggttacatt gaccgatcac ggcccacatt agtggatgca 53220  
gccagccacg ctcttcacaa atcatgtgat gaacattagc tgagttaaaa tttatccttt 53280  
gatgattggt agaaatgttt ttttctccac atcttctctt tcaatttttg aaaaatagat 53340  
ttcttgattt ttgtgctcgt acatcactaa taaatcagtt gttacccttc cacacattgt 53400  
caattttacca tgtctatttc agctcttacc ttgtatagtc ttgactcttg agtcctcgt 53460  
attgactaag ttgctacatg cctcctacaa atcaatagac tgccataaca atatttttcta 53520  
cgacatgac catattagtc catgcaatgc aagtacacac acactactgc acgaaaaaac 53580  
tatgcaccat aacttcaaaa ctaacatgtt agaatgacgt taatttttca ttacaattat 53640  
attcatcgac cgttaattta ctaggcatcc tgttttaaaaa aatatattcac cgaccatacc 53700  
cacatgttcc gtagttcatt aggtgatgga tcggtagtta cagcagctgg atttttatat 53760  
tttggtcatt ttgaaaaatt tatttcgcaa atagactcct gaaaaaactt atcccagaaa 53820  
tagtcccttt tggagcgtca gagtggctgg cgccgtggtc caacgggaca gcgccaacct 53880  
ctctggcgcc gcccccgcc tctattcttg tttctctata tagagttgca aactttttat 53940  
ttttgtttta tttttttgga tgttttttca ctcttagaat cacgatacaa ccaactacaa 54000  
aaaaaattaa actcgaacgg aatatatcac ttagctagaa gtctgaaaat atagcatacc 54060  
acttatctac tttgcacctt caccaaaatt agaccataac ttcttttagta aaatcctttg 54120  
atcagcatat taaacataat gcactctatc actaggtgaa attacttaat ctaattcaaa 54180  
atataactac atgtagcctt gaaaaattct acatgccaca tatttcgtcc gtttgagttt 54240  
attattttta tggttcgttc atgtgagttc ccaagtgtga aaaaaaata aaataaaaaat 54300  
aaaaaagttg cacatcctct cctctgcatt agagaggaga ggagaggaaa aattctacag 54360  
gtcacatatt tcgtccattt gagttcattt tttctatggt tggttcttgt gtgttcctaa 54420  
gcgtgaaaaa aatatcaaaa aaataataat aaataaaaaa attcgggggg gggggggcgcc 54480  
agccactctt aggggtgaaa acgatcggat aatatccgat ccaatctgct ccgaatccat 54540  
ccgaaataag gatatggtat gggtttttag aaatctggcg gatatggatg cggatgagga 54600  
tatggtatct ccgaaatacg acggattatc cgacattttt gtcggattat ccgataggcc 54660  
ctttaccgga taatccgaaa ttatgaacac atgtaaccac tctatctatt gcatataaca 54720  
taagttggtc catccaatga cctaattcat caattaccct agatttctta ctatgtggtt 54780  
ttcaccattt catgtcacac ttgcgtagct gtatttttat aaaatggaca tcatgtattt 54840

atgttggtta gcacttaagc acataattat tacaatgggt cgtttattga cattgtgtta 54900  
tttttacttg cattgctaac tcaatgttgt attgattgca tacacacgta acatctgata 54960  
aaatttaate cgtttctgaa cggattccgc accatttccg acatctgcat ccgtacacta 55020  
tccacaccca ctccgaatcc gcttaaaaaat atggtttagg atatggtatg accactatcc 55080  
gtccgaatcc gctttatitt cacccttagc cactctggcg cgcttcccct gccacctcag 55140  
catcgtccca ccacgtcggc agaaggacgg cggctccage cactctggcg ccacaaaaaa 55200  
ggaccatttc tagcataagt ttttttaggg gtctatttac gaaataagtt tttaaaagga 55260  
ccaaaatgtg aaaaatccag gttacagcag actgtgataa gcaatagcta tattgcctat 55320  
atatacacgt atatgcattg ctaatccttc aattttgtcc aattctttta aattgtcttc 55380  
acctgttgca acgcatgatt ttttttctag tcttaacctt aactaatctt aataactaac 55440  
taaaagatte gtatctttcc gatcgtcacc ttgtccatac gctaattttt cgtccgtccc 55500  
ccctccccct caaaaaaaaaa gggaaaaaatc cattttacac cctcgaactc ttatgcttgt 55560  
ctaaaataca cccccgaact ataaaaccgg gtataataca ccctcgagct atcaataaccg 55620  
gacagttcaa ggggtgtatta tacctggttt tgtagtttgg ggggtgtattt tagataagca 55680  
taagagttca agggcgtaaa tggacttttc ccaaaaaaa atcccagtcg ttactttcca 55740  
tcctgagaat cggagacagg gaaaactgaa gcatacacgc aaatagaatc aaagataggg 55800  
aaaactaagc atatacacac aaatatatcc aaaaattccc atgcagctag atcgggtgcc 55860  
accgttggtg ccaaaccacc acattgcaat gtaaattctaa gactaaagcc taaatcctat 55920  
gctaagtcac caaattagac tcggttctac caatttggtg atatatcaaa ttagacttga 55980  
tttttactga tttgaggttc tcgagggtgc acactatgaa acggaagttt ttcccgttgc 56040  
aacgcacggg cactatgcaa tatcttaact aattaaaaga ttcatatttt tcctttcgtc 56100  
acaccgatct ttcgtccgtc tgtaacatca cgtgcacctc ctctccaaat cccacatcat 56160  
cataatccga ccaaaaaaca aaatctcaat ctcaatccaa tcagaatcat cacaaaatca 56220  
tccaaaatat caagagatga ttataggaga tggaggggtg agcaggagca acatcatcat 56280  
cgcataaaaa ccccaaaatc aatcacaaca acgacatcat tatcacataa gaaaaacaat 56340  
acaaacaaca tacacaatca acaacactgg cggatccage cgaggggaca acggcgtggc 56400  
agcgggcaga tcctctcgtt cagatccgcc cacgggtgcc actgacgtcg ccgccgccac 56460  
cggatccaag ggagaagctt cggacagagg gagagggggg tagaggaccg ctaaaccgc 56520  
ccaccgaaa tgccgccgcc accacctccg tcggatttgc ccgagggagc gccgatgccg 56580

ccaccgccat cgcgggagaa gcttgggcac ggagggtag gaggggggg ggtagagaat 56640  
cgccggatcc atccgctgga aaagcctccg ccggatccgc ctgccggaaa caccggtgtc 56700  
gccgcctccg ccggattcgg tagcgggagc cgccgatgcc accaccgccg ccggatccgg 56760  
tcggtgggag ccaactgacac catcgccgcc gcctcctctg ctaccgacaa gggagagacg 56820  
agaggggagg gggcgagggc gggggacgag aggggtagag ggagggaccg agtgggagag 56880  
agagggacga gtgagaggag ggggacgagt gaataaggat gcgtgacctt atccactcgc 56940  
gcggtcgcac cccggctctt tctctcgtc agctgttgcg cttgtggaga ggatgcgaga 57000  
tttttttttg agtaaaatgc acgggcggtc cttaaacttg tagcggcttg tcatctaggt 57060  
tcccaaactc tcaaaatgca tatccaggtc ctagaatttg tcaaagtgt tcatctagat 57120  
cccaaaccga cacatcctct cttggatcct acatggcgct aatgtgacct gtcacatgga 57180  
cgtgacacgt cttttttttt cttcttttct ttttcttttc cgtttttctt tcattcttct 57240  
ttttttccat cttctgctcg ggtcacatag aaaggaaaag aaaggaaaat acaagagaag 57300  
aaaaaaagaa aaaagaaaat ttttaaattg gtctcattcg tcagtcaaaa ttatgccaca 57360  
tcatgtccct gcgacatgcc acatcagcac cacgtagcat cctgaagggg ttgtggcgat 57420  
ttgggaccta aatgacacac tatgacaagt tctaggacct ggatatgtat ttgagagtt 57480  
taaggattta tatgacacac tactataagt ttaaggaccg cccatgccct ttactttttt 57540  
tttttacacg gagagaatgc gaatttggtg gttagttgcg gctgagggtt tctcgcacgg 57600  
agaaatttgc ggtgggagaa ttttttttcg aggttctttc tattgggaga agacgggatt 57660  
atagggatta ttactggtgt ggtggccctt gttttctttc tttttcgagc ttctttccgt 57720  
taaattcact tttctctctt caaggagcgt aggacatgac tgaatgcagc tgctgtaaat 57780  
tagaaataaa aaagaaacat attctgtttt tcattttttt caataggtaa atataaagat 57840  
ttttaagtaa tatttaaaaa tatatagtgc tgatcaacga cattgttaag tgagattttg 57900  
ctgttactat cacttttttt tccattgggc tcacgtacgg cattaaaagt tttagttttg 57960  
gttctctcct tttgagtttg ggcatatacc aatattgaga taggtatact aaagttcatt 58020  
tggtttttat tcgattcaac ttttttgggt tttgttcagt tcttttttac atgtttctca 58080  
tctgaaatta ggaaattagg tttggtaaag tcttgaatag ataacgctgt tgacgtttga 58140  
acatatatth atctatthtt ttatttaaaa atatatgaat aatttttatt ttgttatgac 58200  
ttttgtcggg gacatgggac cgggagtatc atgactagag gcttgggcag gagcgatcac 58260  
ccacgtggcc tgatgtaaca tcctgaaaat tcccaacaat aaaaatcact aaaattttga 58320

acttttttaa actttttgcat catgctgggt gttatgattg ctattgcttg ccaaaccgta 58380  
aatgatcaca aagaaagtaa agtaaggatc taaaatttaa gtaatagata aatttacgag 58440  
aatataatat ttaattgcta accctacaaa taattacgca caagaaaaca aagccagaca 58500  
aacggaaggt taattactaa tttaaattat ggattaatta ttaaatactt gaaccatgtg 58560  
ttgcgtgcca tggcatctaa atacacatga aataatggtc atataattaa attaagcttt 58620  
ataaaattat gtgaggtttt aattaagcaa ttagcttaat gttgtaccga gtcttaatat 58680  
actatttata gaataaataa attcaaccta tccgtgtaaa atatattgct ataagttcat 58740  
tcaatgtact attgtaataa taatggccac attaggatat ttttaattaat tttggaacct 58800  
tcaaagcctc caaaattatc taggttaatt ttgaaattat acctcattta agtaatgcaa 58860  
tagaaaaata tacataaaaa taaaatatgg gtaatattag aaattgagta aattttcatc 58920  
taaattaaaa catatatagg gtaaacctcc tttatgtaaa aattaagatt tatagaatga 58980  
aatttgtaca agggataaac taaaatcggg ttaaatagaa aatggcactg ttcattgcac 59040  
tctaggtgct cgacgtggtc cctggcccta ttttccccct cagccgcgcg cgcctggctg 59100  
cctcgcgccc cgcgccacgc caccgcgctc gcgtcgccgc tgcgcgcgcg tcgcgctcgg 59160  
ccgttccgcg ccgctcgtcc gtcgctccgc cgcctcgcgc ccgcgcgcgc gtcgctcatc 59220  
cgtcgcgctc gccatcacgc cgcctggccg cccctgacct cgcgcgcgcg cgcgcgcgtc 59280  
cgtagccgcg tgcgcgttcc atcgccgctg ccgcgcgcgc gcccgtcacc gcgcgcgct 59340  
cgtcgcgcgc gcatagcccc gcgcgcgcgc gccatcgtgt gcccggcgcg tcgcgtcgt 59400  
ctcgagcccc gcatccctct cgagccccgc acgtcgcgtc ttgtcgccgt tgctgcgcgc 59460  
tcgtcgtcgc cgatgctgtc gcgtcgccgc tgccgcccgt cgcgtcgctt tgcgccccgt 59520  
gccgcgctg ccgcgttgtc gctgtcacct tcgcgtcccg cctcgtgccg cgcgccaccg 59580  
ctgcgcgcgc gtcatcgccc gctcgtcgcg cgcgcgcgcg ccgctgccgc gccgtcacgc 59640  
tcgtgtcgcc gtcggcctcg cgccttgagc cgccgcgcgc ccgtccccct gcgcctgcgc 59700  
cccgccgcac ggccgtcccc tcgcgctcgc cctgcgccac tgccgcgcgc ccgtcccat 59760  
cgcgcgcgag cccgtgccgc cgcgcgcgtc gcgtcgcccc gcctgtcacg ccgctcgccg 59820  
cctcgagcca cacgcgtcgc gccgtcgctg gccattagg gccggccacc cctttccccg 59880  
cgccctataa aaccccccg ccacccccct ttcacccac accatcccca cccattcccc 59940  
tcttcctctc ctccctcccc tcttcgtccc ctccaccgcg ccgcgcgcgc gccttcgtgc 60000  
cgccgcgcgc tgcgcgctcg tcgcgcgcgc ctgcgcgcgc cgcaccgcgc ccttcgtgc 60060

gccgcgccgt gcgccgacgt cgtgccgccg tcgccgtcgc cgtcgtcgtg ccgccgtcgc 60120  
cgtcgccgtc gtcggtaagc cgccgtccct tccctcgttc cgacgccgtc gccgcccggg 60180  
tggaaggag ccgagagaga gaggaggaa ggagccggga gtaggaagaa agaaaagaaa 60240  
agagagagag agaaaagaaa agagaagaaa agagaaaaga gagaaaagaa aagaaaagag 60300  
attagagaag ggagggaaga gtgggccccca cctgtcatta gccccatcca attcccctta 60360  
gaaaaataat tctgtagaaa agaaaatcaa gatcttgacc ccacctgtca gtcactatag 60420  
cgtgtggata aggttgtatt aaaaataaat gaattaggaa cagtactatt tcgcaactat 60480  
tagaattaat tcaaatttga atctttacac tagcataact aattcatttt agctccgatt 60540  
tgagtggaaac ttgaacctaa attcatctaa attcataagc tttccaatgg tatataattt 60600  
actattaaat aaaatatatt tataattatt aagtaattaa tatcatatga ttaggttatg 60660  
gtcaacttaa aatatgcta ataaataaaa ttagtattgt ggatgtaata atatttgtct 60720  
ctaacatgtc ttgccactgt aacaaccaca caaactaata ttaagtgatg tctgaaatga 60780  
atgaatgaat aggaaaatac tagtacttgt ttaatatctg atagccatat aattaaacc 60840  
atggcttata ggttatttaa atcaaatgta gccttgtgat tatgcaacta aaatataaac 60900  
acatatagat gaatctttag cttgattagg aggaataata acagagctag tgtgactagt 60960  
tatgatatag cttgttgtcg gttgcctata tttagtaaata gggttcaatgt taatacactg 61020  
atgcacacac ataccctttt tgataacct aatagttgat atattaaact tggtataaaa 61080  
tgaagaacca atatattagc taaatactgg tgctagttat aaatcttgac cacacataat 61140  
tttagttcaa accacacctg aggattgttc gttataaagt tataaagtta taaagttata 61200  
caaaagataa tatgtaacta taatagtatt aaaccacaaa tctaaaatac agggcgcata 61260  
attgtcaacc ttttatgcaa acggataata tccatatata tacatcatgt ggataattcg 61320  
aataatagct ccattggtaa aataataatg taggcgaatc atggtgatga gatggtttat 61380  
cctaaacctc cccatcgaca tagccatgct atagggacct gaccatttta ccttcataac 61440  
agatctcttc cataagccaa tagctagact aaaccacaga ttagcaaatg tgtacatcat 61500  
atattgtgct agttagtacc aatagaacca tcaggacaat ataaatacta aggaatctta 61560  
gctcttagct tgattagaat ccaatagcaa acacgagtag tatgagcagc cttaggttcg 61620  
acctcaataa ttatattttg cttgtgcata attgcttctt gttgaatatt gggttttctc 61680  
gcatattata gaaattgtat atcggttagt cgtgaggcaa cgtatgcagc tttcaggagg 61740  
tgaaggttga tcaagattgt atcaagaata atgactattc taagcaggca agtcatcact 61800

attccttgaa catgttgatc ctaattgcga aattattttg ttacaaata aaattgcatg 61860  
caatgatgaa catcctactt gtgattatgc catgccttga ttattgttta cccttaaaat 61920  
ccttgtaacc atgattacgt atgagtcctt agtcaattat gacaattgct tagagatgct 61980  
attctagaat catgcatact cataattatc aaatgctata tgcttgggca attacctttg 62040  
ggaaggtaat tgagatgcgg catgtggaga catgaacgcc acattgccat gatattaatg 62100  
acatgatattg tgaaaggaga aataaaatta aacaactgtt ttcgactggg gcggacggag 62160  
gatttgggtg gtatctggaa aaggctagta ccgtccccgg tcaattaagg accgagccat 62220  
gaagttaagc atgaaacgac ccccgtaaca ccgcacttct cgtatgggta tagacctagc 62280  
ggagtagata gctgagcggg ggcagtatcc atgcatagtg gtttcttgat gtgtgaggca 62340  
ggggctctac ggtggggcag ccattggtag gaccgcaagg cgggtatcta cagtgggtgc 62400  
gccatcggtg ggactgccat gtgagaatct aaaacataat tataacttaa tgcattgtgtg 62460  
agtcttcctt tcccgggtgc gccagaactc ctctcactgc tagaaaccgt gtacgcctag 62520  
agtgcattgag gatgaaaagt tcatggagcg ggtactgcca atgcgagggt atcgaaaagc 62580  
tctgccgtga cgcattctcat gtgttgggac gaggtctatg tgttgggcag tcgcggagtg 62640  
cgggtaaagt gtacatccac tgcagtgtga gtaaaccaaa tctattcgaa tagccgtgct 62700  
cgcgggttatt gagcaccggg acatgtatta cacttggcta gactctaaat tcttaacttg 62760  
tggggaatgg gatattgcat gatgaatttt atgctgatgg agccacatcc cgagaggagg 62820  
gaagggtggac atcctcagaa aaccatgacg attcaatggc gggaagctat ccttgggatc 62880  
acaatggatg gtggacagaa ccgtcgttgt ttaaagtga cactgggtact aaaatttgat 62940  
cgatctatgc taggttttag gcttgtgaaa agaattgtaa aattagcttt atgcaaaagg 63000  
acctgaagcc attccttgaa ataccctcta tcatatgcat tgttattatg gtggcttgct 63060  
gagtacggtt ggtactcacc cttgctattt atatatcttt taggagagtg ttgaagagaa 63120  
gcccttgctg gtacgcttgc gtatcccaca agatgatcgg agtgcggtct tgttctaggt 63180  
ctcgtttccc cagtcgactg cctgtggcat gttaacggg cccttatatt attttgtctt 63240  
tcgctgttgt tctctgatag ttgttggcct acctggccct aatgtaagta tttaactctt 63300  
ttagcctaaa ttcatctgtg atatgttgtg atccaactat gtatgtgtgt accaactact 63360  
gatccaggga ttggtacgga taaacacaga agatttccga ttccaaaat cgggggtcta 63420  
cacctgaccc cctcaggggg ggggggtcgg gcccgagggt gatgtggccg cccccctctt 63480  
tgtctccccg aggggtcgga ccgctcccgt ttctgccccg agggctgagg cgccccgacc 63540

ccttgtgggt tttgcgccgc gtgtatgggt taggtgagca caacggggct cacctaaccg 63600  
tattttattgt ggtttggacg agcgcgtcac gccgcatgta gcgcagtgca gcgcgctcgt 63660  
ttatccggtc tgtgaccagt cacagaccgg tcagatcgtg ggtaggtgg caacaggcgg 63720  
tctgacacac gcctcgcccc atcccgtcag gataagagcc tccaggcact tgtccctagc 63780  
ccggagccag catgctaact cctggagatg acacgttggc cccggtcaga tatatgccag 63840  
gcttcatccc aaccattaca agcaagatat tgtatgaaga agggcgaaca tgcagattgc 63900  
tggactgaca cgtgggtggac aagaatgacc gatttgtgac cggctctgaca ctggtcatgt 63960  
cgtcggcaga caaccatggt cccacgttgc acctgcttcc ggcgagtggt aggtaggtat 64020  
gggccatccc atcagaaggt cgttcggaca gcagccattg caagtctccg cccatttatg 64080  
aagagatgac aggggtgatcc cctggagaga aaaaaaggag gaccttgccc acttaggagg 64140  
tgaggacgac tggaagggga gaggatctgg agagtagatc ccacgagagg aaaaaaggga 64200  
gaagagggtt tctagagtaa gagctctctg actctccagc tctttgtagc ttcttcgtac 64260  
acagatccac cagaaaatag gagtagggtt ttacgcttct cagcggcccg aacctgtata 64320  
catcgcccgt gtcttgtgct tttttcattc tcgcgaactt tccacagact aggagcttag 64380  
aatctcgccc agggcccccgc gccgaaccgg caaagggggg cctgcgcggt ctcccgtga 64440  
ggagccccac gctccgtcaa ctttggctta taattaaata tactctaagg atatTTTTTT 64500  
atTTTTtatt ttcttatgtc tatatgaaat tttaaataag atagatgggt aaacatatat 64560  
tggaataaaca tatatccaaa agtccactat cacaagcgta gcatagatac gattacaata 64620  
cgtttccgcg aagactgttt atacctactc tattccctgt tccttgtgcg gttgtgccat 64680  
ttggggctgt tttttcatct cggattaact cgcgtggaaa ccgcgagacg aatgttttga 64740  
gcctaattaa tccgtcatta gcatatatgg gttattatag cacttatggc taatcatggc 64800  
ctaattagac ttaaaagatt cgtctcatga ttacatgca aactatgcaa ttagtttttc 64860  
tttttatcta tatttaatgc ttcatatatg tgtccaaaga ttgatgcga tgttctggga 64920  
aaatcttttt ttaactaaac atgcccagg tgtttctcca attaagttga cccaaaatca 64980  
ttcggcgtca cctttgtctt tcactttcct tccactacaa ggtgatgaca ctgacaaaag 65040  
gtccaaaagc tacaggatct gatttttgtt catccatctg tgatgtgtcg gcaagccatc 65100  
catggagtgc atccactcaa ctctctctc tcagagagag agagagagag agagacagac 65160  
agacacatgc atgatagatt gtgctagtac ggtagtaaca ttttattgcc tccttttcta 65220  
aaattctagg ttgtttggaa aacaaaaatt ctagattgtt caataaatta ataatttag 65280

gtattttat ttaagtcactt taggtgttaa tttttgaatt tttaaactgct taaactctct 65340  
ttcgacgcat ctgagagcag gtacaatagc agactataag ccagctataa atatatttta 65400  
agtagataaa agaggaaaaa taagagtagc gggctataga tttgtagaca gctgcagcgc 65460  
gagctccaag atacatatgt gtatgacatg tgagaccaa cattaattat gtagtatatg 65520  
tttatatgta tctattgtat gaattggcta tttaaattgac tatgggtgtg ttcggagggtg 65580  
ggtgttggga accatctccc aagcacggaa aacggagcgg tccattatgg cgtgattaat 65640  
taagtattag ctatttttta aaaaaataaa tcaatatgat ttttttaaac aacttttgta 65700  
tagaaacttt ttgcaaaaac tcaccgttta gtagtttgaa aagcgtgcgc gcggaatatg 65760  
agggagaggg gttgggaacc tcctcatccg aacgcagcct atacatgatt tggagccaat 65820  
agttggctat aatattaaac ttgctctgag tggtcttga atcatcgaag tgatagaaat 65880  
catatgcaga aatgtttata tttgtgatgt aaaatttgaa tctaaaatta tttatatttt 65940  
gaaatggagg aagtactacc taaaacaagt atgagaaaga gacatgaaaa acacaaaatc 66000  
tagacttaaa aataattgga attactagca ggaggtcgaa gtcaatcaag acggcgaaga 66060  
aaagcacagg ggacagcaga cacgttaaca cgtaagtaaa caaacaagtg gttaattaat 66120  
tagggggccc tcaagtctcc cctaaagcca ctaaacatga caggtttgtg taccatggaa 66180  
aaaagggtga agcaaaactt tattctctct ctcattagat taccagttgg aaagcaatcc 66240  
tgggacctct agctaacttc attattgtag aacaacgttt tcttagagag agagagagag 66300  
agaaataagt caataaaaaat tactactaat ccacttgaac cagttctgtc ggtgtcggat 66360  
gatttaccac atttgacgaa acggactatt tattcgacgt ttcgaaaaac acactttttt 66420  
agaaaaaaaa aactttcttc tattagccac tcgttttagt tatataccta tccgagtatc 66480  
tgttaagttt atttatcaaa atatttaatt tatctctata attaaatata caatccgtaa 66540  
aaacaatcac gcagtaattc gtttcaaact gagcctcagc tagaaaatca aaatggaaat 66600  
gaataacaat agcaacagta gagttagttt ttcggcttat catccgcaac ccaaagcga 66660  
attttaaact tagccttaga gttaattttt aaggcttggt taccatactt cattttccca 66720  
gcattagttt cttttgtcac taaaaattgt ttttttaagt tgtttcgttc attttctcac 66780  
ggtttatcag cagtagagcg aagccattct tggagcctgt ttggcacagc tctagctcca 66840  
gctctagctc cactctttct ggagctggag ctgagcccaa cagttttagg tgcacaaaaa 66900  
ttaggagtgt agttgggtgg aactctctca caaaaaattg tggagctgga tttagacagc 66960  
tccacaactt cactccaaac ccaactcctg aagttaaatt gataagttga agctctatct 67020



atcaagccct ttttcttgat catgcttcta cctactccat ttttgtttct tggccctcac 67080  
aggaattgga aaggaaaggc gtatatgcat caatgcatgc atgcgcacat caacctcgtc 67140  
catcaaccat cataatcatc atcatctcgc cagctgacga aaatgacctg catccatcca 67200  
tcacggacaa tccaagcgaa caccgctacc aacatcacag ccaacctgtt tatcactage 67260  
tcttgatacc actcctacat aaacactacg cgcagggtta ttaattaagc gtgattactg 67320  
aagtaacatc taatcacgtc ctgggttagcc ttttaataaga caacagttag agcagggtaca 67380  
atagcagcag gatataagcc agctataaaa aaagagagaa aagagcaacg ggctacagat 67440  
ctatagccag ctgtagcatg gacttcaaga cacaacgtgt gtataacagg tgggaccaga 67500  
taataatagt gtagtatagt aagtaactat tatatatatt gactatagat gatttggagc 67560  
tattagtgtg ctatagtatt aaacttgctc atagagcagg tacaatagta ggatattagc 67620  
cagctataaa catattataa tgagataaac attgatagag aagagcagcg ggctacagat 67680  
ctgtagccag ctacaacacg gactccaaga cacaacgagt gtatgacaga tgggaccaga 67740  
tattagtagt atagtaagca actattatat aaattaacta ttacattggc tatagatgat 67800  
ttggagttag tagtgggcta tactattaaa ctttttctct tagcaaaaat caagcgccta 67860  
atcacattag aggagtagct ttgagacaaa ccaattagcg gcgaatcaag cgatctgcgt 67920  
ggtcgtacag tgatgggccg ggccggggccc acagcccgac agtgacaggg ggccctgacgc 67980  
atgtcagcct cagccctgga cgggagctag ccgttgtgtc cccgggggag gggagggggg 68040  
cattcccatc atttcgcccc tcctccgggc ccacatctca gtgggggtaa aggtgtaaat 68100  
tactgcgacc gcgagtccag cgagcctaga tttggacctt gtgtccgttt gactgaaccg 68160  
gagctactcc ccaatacggg gggattgcgt tgtgtgcatg ccatgtgggc ccgagcgccc 68220  
tttgttcgtg gctttgggtt ggaaagggtga ccgtgtgagc tgtgcggtgt tgtactacgt 68280  
attagtataa atcatTTTTG ggtactactc cctccgtcca aagcttattt ataatttgtt 68340  
gtactccaac cgtccgtctt atttaaaaaa aatataaaaa aaattaaaaa aataagtcac 68400  
acataaaaata ttaatcatgt tttatcatct aacaataaaa aatactaatt ataaaaaaat 68460  
ttcatataaa acggacagtc aaacattgtc acgaaaatct aatgtttgcc ttttttttta 68520  
agaccaaggg agtatctacg aacaaagata atacatgtta taatcatgaa gcccatgatg 68580  
tgattagccc ggccgtttga ctaacctcac gagctacgtg gctgacaagt ttaacttgtt 68640  
aactccatca tttcggatac ttagagcatg tacaatagca gactattagc cagctataaa 68700  
catattttta tgggataaaa gatgagagag aagagcagcg ggctacagat ttatagccag 68760

ctgcagcacg gactccaaga cgcaatatgt gtatgacagg taagaccata tgttaatagt 68820  
atagtaagca actatitttat aaactggcta ttagatcggc tatagataaa ttggagctag 68880  
tagtggacta tactattcaa cttgctctta tatgatataa atattgatat aactatatga 68940  
ttttgttaat gacatgtttg tttatggatg gactatgtgg ggtcggtcgc ctccgtagct 69000  
gaccaaata caaacttaaa acccctatct ataaaaatct aacttttggt tataaatata 69060  
gatataaaag ttcataatta gagcctcatc ttttaaacga aaagagtact atgaaaacaa 69120  
ctcgtaatac aaagactaat tacgacgaaa agaaaatagt actgacaaga ggaaagcagt 69180  
gaacttgcac actccctccg taaaaaaaaac caacctagac acggatataa cactatatat 69240  
ctagattcgt tcgttgtaat gaagtgtcac ctccgtatct aggttggttt tttcgtacga 69300  
aagaagtatg agtaaatcta aagctatgta tacccttcgt caaaaaaaaaa aagtaaacct 69360  
tgtactgggt cgtgtcacat cctaataata tattgttttt tatggagggt gtacagttga 69420  
aaaaaattga tgtgttttaa ggatgaaaaa tattggtaat gttggctatg taactctaga 69480  
aaaaaaaaatg cagtaataat aaaatgctaa tttgctggag tactagatta tagacaatcc 69540  
agtccaggac acgacaccct ccctactctc tccacttcca ctctcaccgg ccaccgcgcg 69600  
ctctctctct ctctctcccc ctctctccgc aagattcttc ccccaaatec caccgatec 69660  
accgccgccg ccgctcgcg ggagtcccat cgctgccacc gccgccggag ccgcggccccg 69720  
acgccgccg ggccctgctg ctgtgtgtgt gaggagggtg agttgctcgc gctcgttccc 69780  
gcggccacct ccgcctgctg ctgcttctgc ttccgctggc attgcgggga ggtcgtgtgc 69840  
cgggggacgt gggggctcgt gttggagcgc ggctgccgtt gaggtggggg gtgcggcgcg 69900  
gcgcggctcg cgctcgtcgc ccggtggcgc gggcgcgggg ggaagcgtac gggggagggg 69960  
gagtgtggcg gcggcggcgc gcggggtagg gacgggcgcc gccaccacca ccggctcgtt 70020  
cgctggcagg cgctacgcgt ccagatccgt acgccggtat gcttcgtctc gccgcaactc 70080  
tctccatttg attagtatcc cctcgccgaa acgaggcctg tgaggcgccc gctttctggc 70140  
tggttccct gtactcgtg cttgctcctg cctgttgggt taaccggtt ccatcgaatt 70200  
tggttaagcg aaacatcgcc tcatatgggc atttggggtt ctggcagcct taggctcgcc 70260  
atccgtcgcc gagcttccaa gtgaccggcg cttgttggtat tatttgcttg cttgttcctg 70320  
tttggtggct gcgctaaatc ttttgtgctg cattgaattt atgccacca tatacagcaa 70380  
attactgagc tgaaataatt cggctaatta ggtccagcaa tatgacatct cgtggattga 70440  
atgctaagct gacattgtat cactgatgct ggcttatata taggttggtg agaagtgaag 70500

atgtcgacag gtgaaaccct gcgtgcagag ctatcatcca ggacgccgcc tttcggtttg 70560  
aggctatgga ttgtgattgg aatcagtatt tgggtgggtga tcttctttat actaggtttc 70620  
atgtgcctct ggtccatata ccgaaggaag ccgaagaagt cctttgataa gattccagta 70680  
tctcaaatcc cggatgtttc caaggagatt gcagtagatg aagttcgtga gcatgctgtt 70740  
gtcgaaaact tccgtgtgca agaaagccac gcgatatcgg tgcaggagaa acattacgag 70800  
aaagattcag ggaaaatgct ggcacacttg gttaggagta aatcgagtga tgccgataat 70860  
ttgagccaat gcagctcggg gtaccaatgt gatagggctg gtagctcgta ttctgggtgat 70920  
gaaggcagct cgggcaatgc taggaggcac ttttctcaat atgcaactgt ctcagcatcc 70980  
cctctggttg gtctcccaga attctctcat ctgggctggg gtcattgggt tactctgaga 71040  
gattttggagc atgcaacaaa tcggttttcc aaggagaatg tcattggaga ggggtggatat 71100  
ggggtagttt accgtggctg actcataaat ggaactgacg tcgcaataaa gaagcttctt 71160  
aataatatgt aagagatcct gaaatctatt ctgcgtttta cagaacttgt gactccttct 71220  
gatgccatca tattaatttt cttttgatat ggtgctgcag gggccaggca gaaaaggagt 71280  
tcagggttga agttgaggct atttgccacg tcaggcataa gaatcttgct cgccttctag 71340  
gatattgtgt tgagggaatc cacaggtaaa gctatttatc aatcaccttt gctgatggat 71400  
ggctagcttt tgtttctact ggcacattat ttacttgcat agggatgtag gattgctctt 71460  
ggtctatgtc cacctactca ccagattatc tcaagggata ggttattcct gactgcactc 71520  
cttatgctat cgattttttc ctttccaaat ctgatggtag gattcagcat gcccagtgac 71580  
agattatgct cagtccacag aaaccttctt tggaccacca ttcttttacc atgaaaatgt 71640  
ggccatagct ccgaaagcta ggattcacta gaagcgcaca actgcttatt ggtttgtag 71700  
ttggctataa caaggctcta ctgaaatgta cttccatagt tcattacttt gtgaatgcct 71760  
gttcttggtc ttacagtttc ttctcatgca tgttcaatc taaatttgta ttcatgatat 71820  
gtccaagcta ctgtattctc caaagaaaat cagaagtcca ttcacctatg tattttccag 71880  
ttttccgcca ttttggatac tgctctagaa acaagttaat aatatagata tttatatggt 71940  
ttggccagtg ctgcttaagt gaccatcgag atagaaattg ctttaagaaat atactaagat 72000  
gttgagtgtc aggtgttttc ggataatctt gttaccaaca aataggctct atgaatataa 72060  
tggtgtctgc ttcacgtaat tcaaaatcca cactcagcca aaataatctg caatagggtg 72120  
ttgaaaatat gattatgttt ctcccttggt ttcatcatga ctacagaaat gaacaatgtt 72180  
gtacatctt gtaataattt gtggttttca attgaacaaa acatccatca aatgatatct 72240

acagcaatat attttgcact tctgagcaca caataggttt gagtgtattc gagtcatggt 72300  
cattgattta agctttttat ttactacat aaccattgat ttgagtgtat ctaaggagtt 72360  
ctgtttccac aagtacttta tgttaatggt gtctccttat gctttggcca tccaaactca 72420  
ttactgttgt ttaatatatt tagtggttag tgggtgtccaa atctttcttt gtgtacatca 72480  
tactatgttt ttgtagtcta ttaaacttcc atcctatcat ctgacttggt atattccagg 72540  
atgcttgtat acgaatatgt gaataacggg aacttagaac agtggcttca tgggtgccatg 72600  
cgccaacatg gtgttcttac ctgggaagcc cgaatgaaag ttgttcttgg aattgctaaa 72660  
gcgtaagaaa caaaccatcg tccccgtcaa aaagaaaaga attgttcttc actttagctc 72720  
ttttatatgt atatgttttag ttgcataacc cattttccat aactgaattg gtatacaggc 72780  
ttgcttattt acatgaagca atagagccaa aagttgtaca ccgggatatc aaatcaagca 72840  
acatacta atcgatgaagaa ttcaatggca aactttctga ttttggcttg gctaagatgc 72900  
tgggtgcagg gaagagccat atcacaactc gagttatggg aacttttggg tatgttgata 72960  
tttttttga gttagtatta atctttccta tgcttagctt ttactgttgg aatgtgcagt 73020  
acttcgctta ttcatagct ataaaaattt acatgctgcg aactttgtcc ttcgtatatt 73080  
ataacaggta gctttctcat tgctatcatt gattcatttc aggtatgtgg cccctgagta 73140  
tgccaacaca ggtctgttaa acgagaagag tgatgtctac agttttggtg tgctattact 73200  
ggaagcagtg actggtagag atccagttga ttatggccgg cctgcta atg aggtgagcat 73260  
atatcctaca atctcatgcg tattatgtat gttacaaaag tccgtactat tggaaattat 73320  
tttacggcaa aataacgtct atactaggag agacgaattt gcttcagggt tatggctgtc 73380  
tggcagttgt ctactgtcta gttacccttg tctcactttt acagtctatt gttttatttt 73440  
tcaggagctg actagctgta taccttgtea tatatacaa cactgtaacg tggatgcctt 73500  
gcagggtgcat ctagtggagt ggctcaaaat gatggttggc acaagaagag ctgaagaggt 73560  
agttgaccct gacatggagg tcaaaccgac cattcgggct ctttaagcgtg ctctcctagt 73620  
ggcactgagg tgcgtcgacc cagactctga gaaaagacct actatgggtc atgttggttcg 73680  
gatgctcgag gcagaagatg tcccatcccg tgagggtgta acgctttctc ctttcctgca 73740  
ataacattca tcatattata tcattgcaat aaatctgaag cttttgctgt aatcctactg 73800  
aaggaccgga ggagccggag gggcaacact gccaatgcag ataccgagtc caagacaagc 73860  
tcaagcgaat tcgagataag tggcgataga agggactcag ggccatcagc aaggtttcaa 73920  
ctctaagaag acggtgatca tagtcaagaa caatggcttc aaaactctat gcagtaacat 73980

ggtggttggc agagaaaaag gggatatttct ggagggcatt gcattttgta ttgtaggtct 74040  
gcatggcggt agagactgga gagagcacag tgtctgatga tggatacccg gagacctgta 74100  
attcccattc agtattctgt ttgttagtca agcagcttgt acagatcggt gtctgttcca 74160  
ttttttcatt cttctgggtt ttttgttttag gaggtctcttg gattaccagt acgaaccgct 74220  
gtctcttttc tagaatcacc aacatggaac ctatcaatat ttactactag tactacgact 74280  
tgctttcttc ttgctgagat ctatcatgta ctgtacataa ctgacgtgtt cagctgcaact 74340  
tggacaagta gatgctcggt ctgtatgtcg aatttacttg atgaggtcga gcattaagta 74400  
ccatggctgc agccggcttc tgttttagttg tgctgacatg cggcggcgac ctacacgtgt 74460  
gtggcccatt cttgatcttg ggccgaaact gtagcaacgg gcgtacggcc catctatata 74520  
gggattgttc ggcccgttgt agatgggccg gatcgggatt gcgacttacg tgcgacccat 74580  
ttcggttggg ccggtgggtc gctacttcat ctagcagtgg tcggcggcag ggttcacaat 74640  
tccaatagaa tccaaacatt attggattga gttaaaaaca caaaccaatc ggctttttgt 74700  
caggttcaga aaattttaaa ctgaatttta attttttgac aaaaatctat ttagatttcg 74760  
tctgtttttt taggtttgtc aacggattca gcgaaatccg atgatatcgc tcgtgagtgg 74820  
atttttgatc cggtatcgag attgtgaacc cttgtcgcgc attgcctgac aaagacaacc 74880  
agtgaagcgc cgtgcgcgcc gcgtgcgcgc cgcgtgacgc gaagatgcgc aggaaggaac 74940  
aagctggcaa gcggcgcgcc catgacggcg gcggcgacga cgacccgcgc gcgtgcgtgc 75000  
gtcaacgcac gcgaccggcc gagatccgtc agtggccgcg gctatatata atacatcgtc 75060  
gcctcacacc cccacacac cgagtcacgc ctgcgccgag ttagagttcg tagcggcgaa 75120  
ggatatagcc atatattata gatggcgatt ggtgttgggt gctgctgcgc cgtgctgctc 75180  
gcggcggcgc tgctcttctc ctctccggcc accacatgta agcacgcca tcttcttctt 75240  
cttcttcttt ttttctttct tttttttttt ttttttgaaa tgagccgcag ctgacaaaaa 75300  
gatcactcac acatggatac actgtcgtga cactaaccaa tgcctaagcc attttgtttt 75360  
cttgtttttg atttttcttt ttatgtgtat cacttttget tgttgctctt gcagatgctt 75420  
atgattccct ggatccaaac ggcaacatca cgataaaatg ggatgtgatg caatggactc 75480  
ctgatggcta tgctgtaagt agcgggtggca gtacaccaac atctctacct ttattttcgt 75540  
ctcaacctgt acatttacac tatcttggtc tactacctct aataaaaaaa tatatttgat 75600  
gttttaaaat ctattaagtt ctagagatta ggaaagctac acatggtttt atgttttgat 75660  
actattaagt agtatatttt ataagttata ttgaaggctg gggtttcaaa agtttgacta 75720

cactagatct tattcaaagc gtctaattgat tactgaacgg aggaagtatg aacttataga 75780  
 cttgaagtta aacagcatag ccacatctct tcatgtatac ttcattccgtt tcatattata 75840  
 agattttcta gcattatcca tattcatata tgtgcgtcta gattcattaa tatctatatg 75900  
 aattgggcaa tgctataaaa tcttataacc tgagaaacgg agggagtatg tcgcaaaca 75960  
 caacaacaat aacaacgagc aaaatctgta tcgaatccgg tttccctctt gtaactgtat 76020  
 caaagatctg tcctctgaaa cgtcccctgt tcatcaggcc gttgtcacac tgtccaacta 76080  
 ccagcaattc cggcacatcc agccaccggg gtggcagctg ggggtggacat ggcagcagaa 76140  
 ggaggtgatc tgggtccatgt acggcgcgca ggccatcgag cagggcgact gctccatgtc 76200  
 caaggagggc agcaatgtcc cccacagctg caagaagcat cccaccgtcg tcgacctcct 76260  
 cccgggcacc ccaatcgacc tgcagatcgc caactgctgc aaggctggat cactgagcgc 76320  
 attcagccag gaccgcgcaa attctgccgc gtcgtttcag atc 76363

<210> 28

<211> 53905

<212> DNA

<213> Orza sativa Asominori

<400> 28

gatcagttag tgagagtgat gtgctattga ttttcgtcta ggattttgct gtgctcttct 60  
 tcttcttctc ctctctacca agaaagatcg atggaggaga atttgtagga cgcgtttctc 120  
 acgaattact tagctgttaa tgatcagctt gatgtgtacg atatgatggg gcagagtga 180  
 agttgtgttg ttcactgggt gatcatggga tgggaatatg ggattgttgt aagatgtaac 240  
 tcaagtgttt tcttttttgg gattactttt ggtaataaga gcttgggtga tcgaaaacta 300  
 cagatgggtt ttcttttaag ttgtatgac tctgtagagt ttttgagtaa tttgtagttt 360  
 tgtaccctat caaagatcat ctctagctgc ctctgagctc tccaactcta tatgtccatc 420  
 tctagtatat atgtcccata tttctgactg aaaattttca agtcggttgg ttcctccgc 480  
 ctggatattc tttcagctaa ttagattttt tttaaatgat aaatttgcta aaagcttggt 540  
 caaattcagc taagatctat tcaaacttca atttctctat cgaaattccc ggaaatttca 600  
 attcaatcat tccccaatac atgccgattt ccgtaatat gaaccatgac atgtaaaca 660  
 cgaaggaatc aagggcata ttagtttcat ctccatcga atatacggac acacatttga 720

agtattaaat gcactctaata aacaaaacaa attacagatt ccgccagaaa actacgagac 780  
gaatctatta agcctaatta atacatcatt agcaaatggt tactatagca ccacattgtc 840  
aactcatgac gcaattagga ttaaaagatt cgtctcgcag tttcctgacg aaccgtgtaa 900  
ttattatattt ttctacgttt aatactttat gtatgtgccc aaatattcaa tgtgacaacg 960  
tgaaaatttt tatttggaac taaataggcc ctaatatctt ttcaagatat tagaatagtt 1020  
atccctctcc acctccctgc acaaacagtg aacttctttc tccttgggca caggagtagt 1080  
agcagctccc ggaaacagaa agcaatcaag caaagtcctg aacctgaagc atcctgaaac 1140  
cagcagacgg cagaaaccag tgggcgcagg cgatagcagt ttttcgtggt ccggcgtaca 1200  
gccaaaatac tggccatcgg gtgcctacat agaagtgagtc cactggacgc agctaccacc 1260  
gtgtgtgcta cactgaccgc cgctgctcgt cgaccagttg tacggggctg acttattctg 1320  
aatttctaata ggtttatttg ggggtttaga aacttgaggg gtgctttaga tccaaagatg 1380  
tgaagtttgg gcgtgtcaca tcgggtatta tatatagttg cgcacagggt gtttgggcac 1440  
taataaaaaat actaattatt gatcctatac gataagctat ataatactcg atgtgacacg 1500  
ccaaaacttt acatccctga atctaaacac ccttttaaat agagtatttg gtgtgaaata 1560  
taattttgat ttgggaagaa ggtgagtgag atttggaata aaaaagcatt tcaattaaaa 1620  
aatttgccag cagtaaataa agaaactact cgggttttgta attaaagtga ggttttggca 1680  
cttctttgcc ctaaactggc ctccatttta taaagtgaga accgtgcagc aaaagcctga 1740  
aaaggcaaaa agaaagaaat tgtagagggt tttcaggagg atacaactag gtgggtctct 1800  
aactctctat gcagctgtgg tctgtggagc aaaacgatga aatggaagac gggacgttga 1860  
cgagggtgaa gaaaacgagc gtttgaccag cgtcaaccat ggcgtaaca gtagcaccac 1920  
taacctgacc gagaggttga agaagatgca atcaacgggg tactatagtt cccacgaatt 1980  
tcccagcaac aacgggttgg ttctcactac tcacgaattc cctgtggctc aacaactact 2040  
agtacatcct tttgtccatt atgataaaag ttctatctta atttttattt acacgttttt 2100  
caaactgttt ttttaattttc tatataaaaa atacttaaaa tatcaaataa aatctatttt 2160  
tgaggtttta aaaaactcaa ttaatcatat atattattga cttattttat ttacgtgga 2220  
ctaaaatata ttcatcttca tttaggttat gttcttttct catcaagata catgatacat 2280  
tagcatgttt ttcaaactgt tttttaattt tgtatataaa cttactctaa aatatcaaat 2340  
aaaatttact tttagggttt ataaaagtaa aactcaatta atcattacta acttgtttca 2400  
ttttacgtgg actaaaatat cttcatcttc atctaagggt gtgttttgat ccaaggacta 2460

aattttaatc cctatcacat cggatatttg acactaatta gaagtattaa acatagatta 2520  
atgatgaaac ccattccata accctggact aattcgcgag acgaatatat tgagcataat 2580  
taatccatga ttagcctatg tgatgctgta gtaaacaatgt actaattacg gattaattaa 2640  
gcttaaaaaa tttatcttac gaattagctc tcattttatac aattaatttt attgttagtt 2700  
tacgtttaat actttttaatt agtatacatc cgacgtaaca ctgatcgata caaacaccaa 2760  
ctaaatcgaa aatcaccgaa tggctcgtca tcctcccaca tgagatgcca agatggaaca 2820  
ccaacaatcc aacggctagg aagcgcccca tcccaccac cgcctaaccg ccttcctatg 2880  
caagtgggtc ccaccccttc cttccttttt tttttctttt tacaaatccc cttccctttc 2940  
ttggctagct agctagcttg gcccaacgcc acgagccgag ccgagcacat ccggagccaa 3000  
gccgagctca gcgcctcagc tccccctcct cctcgtccca ttcccggttt cctcctccga 3060  
tttcccccaa atccgcacgc ctctcccctc cgcctccatt tttcccgatt cccaattccc 3120  
aaatccggat cagccgcagc cgcagcagca aaaaatttcg aaatccaaat ccaaaccat 3180  
ccccccacg acgacgtcac ccacatcccc acccccgcga gacgagacga gacgactccc 3240  
aaatctctct ctctctctc ctatgcgcgc cgccgccgcc gccgcagcag cagcagctag 3300  
gaggcggagc agcagcagca gcagcagctg agatgatcgt gcgcacctac ggccgcagat 3360  
cccgtctctt ctccgacggg ggaggagggg agcgcggcgg cggcgggtggg ttctcgtcgt 3420  
cgcaagacgc gttcgaattc gacggggagg aggaggacga cctcgtcctg ctggggtcgt 3480  
cgtcgcagtc gtcgcacccg cccgcgccgt cgcaggagtc gtcgtcgatg tgggacttcg 3540  
acgaggaccc gccgccgccg ccccggcggc ggccgggggag gggtgggggt ggggactacg 3600  
cggagcccg caccggcggc gcggcggcgg cggcggccac ctcgctcatg gaggcggagg 3660  
agtacggcga gatgatggag agcgtggacg aggcgaactt cgcgctcgac gggctgcgcg 3720  
ccaccgcgcc gaggcgggtg cgccgggcca gcttcctcgc gctgctcggg atctgcgcct 3780  
ccgcgccgcg ccgccgcgtc ctccgggccc aggggtcgtt acaccaaaga accctccttt 3840  
tttttttctt acttgctcgc gctgtaagta aagaataaca attcgcgttc ttgctcttgc 3900  
ttcgcgggca atcttggtga ggaatcttgt tagggttatg aaattgggca gccagtctt 3960  
gtttcttctg cgtaatcttg gcggaaacag tgggattttg tacgattatg gctccgtaat 4020  
cggcatttct gtgggaaatg aaccacctt agggcatttg accttcgaac agcatgcttg 4080  
gtgttgcaat ccgtagctat tgccttcac ttaggcacaa gaacttgttc tgaattatga 4140  
tttaccact tgtgtttgtt ttcttgttct gagttttctt gcttggttag ggtagggtt 4200



atcacctgtg tgggtgcagaa ttagatgttc gctacttgtc ttaacctctg ccttgcccaa 4260  
tttggtaccg agtgttacag ctgggttttag gaagtgtgat ctttgagcat ttctagcatg 4320  
ttggtctctt tattttgcta atctcacatg gttgtagagg aaggaagcat agtgactgat 4380  
gatgaatgcc tagatactag aaatacatct ttattaaactg aattaggatt gcttgggtat 4440  
ctatgtagat atgactgtag aatgttactg ctggaaatgc tatccaatat ccattgatct 4500  
ctagccta atctctctcg aggccaagag atcagtcaat tttgaacttt caggagagtt 4560  
tctatttggt acttaatctc ttttatttgt tacttttggt gcctggctct cttttcatga 4620  
ttgctaagta gacaggtaaa gttctaccta aaattattct taaaagttca aaatcgcttt 4680  
agattaagga gtgccagcca gagccttagg cagagtctta taaacaaaaa gcacaatgct 4740  
acaatgttca caaaactttt gtggaatttc cacttgagct gtataaacat cgcaatctac 4800  
tgtgaataaa agaagcactt gatggaagtt catgttagca aatgacatgt tttctgtgag 4860  
gaggttgatt gcttgaactg ttatggactc ttgcaacttt ttattttact tcgtacccat 4920  
ttatgcta atgtgcacaaat aaaattgctg agagtaaaaa tgtacaactt gttacgcacc 4980  
agcacacttc ctatttgtat ccattttcct gttgaatttc aaatgtattc aattgctgaa 5040  
attgttccat tcaacaaaca catattccgt taatgaaatt attatacatt gcgttttggt 5100  
ttcttactca caagtgtcct cttttcttat atcctataga ttggtgcaac aaattattga 5160  
tgcaattttg gttttgaaca ttgatgatcc tccctgcact attggtgcag ctgctcttct 5220  
attcgttttg gcaagtgatg tgagtacctc tcaatcccat ccttgtgctt ctgtgcatgc 5280  
ttcattctat tttttacgca tategattgt tttcttttat ataacagccc ataaaaataa 5340  
tcacatcatg gcaaagttat ttatttctcc agtacagtta tataagtatt caccactttt 5400  
ccatgaatat cttggcatgt gattacaaag aagattatit aagaaagtcc atgcttttat 5460  
ttcatcattt tgtttgaagt tgaactttaa tttatgggtg aaatttcagt taatattgct 5520  
agcagctcgt attctttaat ggcataactt cacttgtgct tattctccaa tatctccctt 5580  
cttggtgttc aggttcaaga aaatcatttg ttggattcag aatcttgtgt ccattttctt 5640  
cttaaattat taaatcctcc agtgaatctt gttgattcca aagcaccatc gataggttcc 5700  
aaacttcttg gaatcagtaa agttcaaatg cttaatggat caaataagga ttctgactgc 5760  
atttcagagg aaatcctttc aaaagttgaa gagattctct taagctgtca agagatcaag 5820  
tcgctcgaca aagatgacaa gaaaacaaca aggccagaac tgtgtccaaa gtggcttgct 5880  
ttgttgacaa tggaaaaggc atgcttgtct gctgtttcag tggagggtaa gttttaatca 5940

aatttccttg tcatgatttc cctttatgac cattataatt atttttatga gccaaataag 6000  
cagttgccat aagttacata gcacctgttt acaatattca tgggtggttt gcttagccct 6060  
ttgcttcacc tgcctttgat tgatgacttc catccgtgtt gcacaactga attggagtaa 6120  
ttgactgcac tagaagcacc tatggccatt gtcatactag gaaggttttc ccttatcaaa 6180  
tatttgattg ttacagagac ttctgacact gtgtccagag tcggaggaaa ttttaaagag 6240  
acattaaggg agttgggcgg tcttgatagt atttttgacg ttatgatgga ttgccattca 6300  
acattggagg tgagatctcg ctaacatcgc atattttaca cttcctttgt tcaactctaa 6360  
aggatgggtgc aagttttgtt cctttttgcc attttagctt taatgtgctt gaagccacat 6420  
gaaagcaatg cttgtccaga tacatagcca aaggttgtta tattttggga catggaaaat 6480  
gcttgaggta gtaactatth tcatcaggac atggaaaatt ggctgcatca caaattatgt 6540  
tgtttcatgt tgcaaaatag ttttttaata cttttttatt ctgcatgtgg tgttagtgtc 6600  
ttacagtgat tcctctgatg attatatecc ccacgataat aatacttgac atatctacac 6660  
caagtggaca ttattcattt ggatgttact tttccagcta tacttgctgt tcttgcataa 6720  
actttggagt aaattgcgta tccctttaag agataaactg cttggtgctc ctatctgtgt 6780  
actttttatg cccccaacta ataatgcaat catattacgc tgataaactg aataaataaa 6840  
ttaacaatat acttctggtg gaaacctgt gtatcagaat ctcataaagg atacctcaac 6900  
ttcagctttg gacctaaatg aaggaacatc tttgcaaagt gccgctctcc tcttgaaatg 6960  
tttgaaaata ttggaatg ccacatttct aagcgatgat aacaaggtaa tgttccttat 7020  
atattctgtt tcagtttagt acccattttc ttcttctgta ccatcttctc ccctcatttg 7080  
ttctgtgcaa aatgtgcaa cagtgtgact ttgtatttct gcttaacatt tttctttttt 7140  
tcctgaaaag cagtataaac tcttacactc attttgcttc ttgcagaccc atttgcttaa 7200  
tatgagtaga aaattgtacc cgaaacgctc ctcgctttct tttgttggtg tcattatcag 7260  
tattattgag ttattatcag gtatttttct taataataca atatgtccgc taacacaata 7320  
aaatgtttta aacatccagt atgttaaagt tgcagtctga cgcctatttt gttttgctgc 7380  
agctctttca atactgcaga attcttctgt tgtttccage tctacatate cgaaatcgtc 7440  
taaagtctct caacagagtt gctctggtta taacaaacac caaatttggt tgatcaactc 7500  
gttggtttt ctgtgcactg tttcaatata gtttggtcgc cattcaagtc tcaactacaga 7560  
tgttgaactt gacctgacac ggtggcacca atatttataa aacgctacct gatattttta 7620  
atatttcatg tttcctgacc cagattatct tgttggttcc tcatataagt ttaattagt 7680

tcgtttcttga aacttttgta tgcagcagat gtcatggggg gaacttcatt taatgatgga 7740  
aagcgcaaga actcgaagaa aaaaaacctt ttgtcgaacc agacacgcca tagttgctta 7800  
tcttcaaaat cagaagtttc tcatattact atatcttctg gtagtgatgc tgggtctgtca 7860  
cagaaggcat tcaattgttc tccatctata tcaagcaatg gggcatcaag tggttcatta 7920  
ggcgagagac atagcaatgg tgggtgctttg aagtigaata taaaaaagga tcgtggcaat 7980  
gcaaatecaa ttagaggctc aagtgggtgg atttcaataa gagcgcacag ttctgatggg 8040  
aactccagag aatggcaaa aagacgccgt ctatctgaaa atgtaatcac cgacagtggg 8100  
ggcgggtgatg acccttttgc ttttgatgat gttgatcagg agccttcaaa ttgggaactg 8160  
cttgggtccaa aaaagaaatc gcctcagaaa catcaagaca aatcaggaaa tggagtgcta 8220  
gttgcaagtc atgaaccaga ccaacctgaa gatcttaatc agtcgggtac aacatctctt 8280  
tttagtgcta aagatgaatc cagtcttttg gaagactgcc tcttggcatc agttaaggta 8340  
attaaatatg tttccttctg atctttcttg tttcttcttc aagagaatat acattcttgg 8400  
gtcacagttt ctcggtttgt ctttgtgact ttgttgagtg acatattttg aattcacaaa 8460  
atttcctttt caatatggct cctcaatcta tagcatctgt cgtgtatgta ttctgtacaa 8520  
aatagtattg taacatctcc tagaagaaat tggcaccatc catatcatac agtagcaatt 8580  
tatgagacgt gatcctgatt ggaggtttag gacagagcct cgagctaaat tgctattgta 8640  
ttgtatctac tatcttttag tacatgatat gtgctgggca ctctgtgtct gagtgtagt 8700  
agtgccttaag ttacatagt tcagctaaca tgcataatgta agacagttta tgattaaatt 8760  
taagtgtaga aagaaggtag tttcaaaaga tttttaagga caatataatt gtttcaccgg 8820  
gactcatgct tgttctgact gtgagcctaa tgttacctt acatgccctt acattgtcta 8880  
ttttttatcg ttttatgaga tcttccaaac aacttgatct gtcttaatgt ttttttgcta 8940  
gctcctttct tggatatctg gtaaattggtt aggccgaagt atgaacttg ccttattggt 9000  
tcaaagaaaa tgtaacaact cctggaaaag tctaattttg gttgcccttt attttgctga 9060  
ccgtattggc acacatctaa ttctgtgtgt cctttctggc aggttcttat gaacttagca 9120  
aatgacaacc catctggttg tgaattgatt gcgtcatgtg gtggacttaa caccatggcc 9180  
tccttgatca tgaagcattt cccctcattt tgttttgtcg tggacaacaa ctataacacg 9240  
agagatgtca atcttgatca tgagttatca tcttctcaaa acagcaaggc acaccaggtc 9300  
aaaattaagc aattgcgaga tcatgaactt gattttctgg ttgcatatt gggcttgctt 9360  
gttaaccttg tagagaagga tagccttaat aggtaagtcc ctacatgct tccttcatt 9420

tgctcaattc atatcagtgt tactgttctg gcagttcctt ggggtcagga ctcagaaaca 9480  
tccaattaat gttcatgttc tcttaacgac tcagaaatac tttataacct ctccacaggg 9540  
tacggctttc atctgcccggt gttcctgttg atctatctca gaatccacag agtgaagaga 9600  
cacagagaga tgtcatagca ctccctctgtt ctgtattctt agcaagtcaa ggtgctagt 9660  
aagcttcttg aactatatca ccggtaatc aaaattcttc aagttccttt tgtatgtaga 9720  
ttatatcttt gtaaaactcg gcatttatta cctgctcttt gtttcaaaaa gcagtatttt 9780  
attttgctcc ttagcatagg tcagcagaac agttgatctt attcagaaaa caatattttg 9840  
catgtaacat actgttatct atgagatgaa aattaatgca tgtgtaataa tgtcaatgat 9900  
aaatatttgc tatctgaatc cagtctacca actctagtta gaccgaaatt actgaggttc 9960  
tatttcaaag aataatttag tgcaccattt gttcaactac tatgaagtaa aatggatttc 10020  
ccttctattg acatcggggtt agaagtgaag ggccatctta atgcaatgtt ctcaatgcc 10080  
caaaccaca aatttcatta acacatacag attattatta acatagctat aaattggatt 10140  
tccagaagct tgagttgaat ttattttgtt acaattgaaa gcactgggaa cattagcatt 10200  
tttttttagt tcttggttat tgcaatttat aatgttatac agaactgtgt acctcacaat 10260  
gcattcatta tgacattcta tgaaccattt gattgactgt tgcttgtaaa caacaggatg 10320  
atgaggagtc tttgatgcaa ggagcacggg aagctgaaat gatgatcgta gaggcctatg 10380  
cagcccttct tcttgcggtt ctttcaactg aaagggttgc aatctgtagt tgatggattg 10440  
ttttattaat gtctaactac ttgcataatg tcagcactat ggcatTTAAC ttatactgtc 10500  
tgttaactgc aacagcatga aggttcgtgg agccatttcc agctgccttc caaataacag 10560  
cttaaaaaat cttgtgcctg cgctagagaa atttgtggta tgtctccata attcttgaac 10620  
tactgtttgt ataaaaaagt atggatgac tttgaattta ctccattttg gaaatcatta 10680  
atttttcatg tctgagggtg gaggtgtcac cataattgta cttcccatcc aggaagcctg 10740  
tttgcaaaat ttcacataaa taaggaaaat ttgaacttgt ttcaagtttg aatagtaaca 10800  
ggatgtttta tttctcaact ggagaaaaca ttccggctgg gacttttaac ccttaaaatg 10860  
ctagtgtgct cccactgtaa gattgtctgc tgtcacattt gaaactttgt gtaatacctt 10920  
tatcactacc cttgagatga gagacacaat ctggtaccga gtttaagttat tgataactcc 10980  
cagttgaagt acagcaccaa atcaagccaa catgttggt acgtaattaa atgttctctt 11040  
acaacagata gaggtaaaaa gggagtttct aagtatctaa cctcttacc tcttggttta 11100  
gcactccagg cacaactctt tcttaacttg cgatttagga cttgactctg agaatattgt 11160

gtgcccacac tggttgagtg catgcctatc taagctgcta gtttttgttc attttgatta 11220  
 actctgaagc tgcctgagct tattctgctt ccatcattta ttaatccatc atgtttctct 11280  
 ttcagtcggt ccatctgcag ctcaatatga tcacagagga aacgcactca gctgtcacag 11340  
 aagttatcga gaaatgcaaa ctttcataga aagagtgaag aggggcctgt acagatcaac 11400  
 taacaacctc tttgcagcaa aaaagcatac acacaagtgt ttgtcttggc ctggggctct 11460  
 gcagatggac tgatactctg acctgcagtg ggcttgggag ctaacaatgg tttcattctt 11520  
 ttttttttta tgttttcccc tgttgttttt gctcatgttt tgtgtaattt tttcttctca 11580  
 tctagcgatg ttatttttct tagcatgatg ggagtagccc tccttttttt tttctctaata 11640  
 taagtgtaaa gtagcaacag catagggatg aatgttcagt gtagtgtgtg gtgtttcagt 11700  
 tattcagaga cgtccataca gtttgtacct tgtgaccaca cgtcttaatc tgatgaagct 11760  
 tagaataaat cacatgtag caatgcaata tcactctgcg cttctctcac tttgggtggcc 11820  
 atcaaattct gtgtagaagt gtatgggttg tgtgctgttg caaatgccgt attccgctct 11880  
 gttttgtgga agttaagaag tccctagtgt aaataccgat ttttcatgat ctcggagatt 11940  
 gatgcaactc tgattgcagc atttcttttt attagaatgt acactccatg ctatcatgat 12000  
 gtttattggt tagtactaca agatttggtt aaccattatt ttaatatcat aataatttta 12060  
 taaaatcttg gagtaacaag ttcataatac atgatagcat aactttttga ggctagtcta 12120  
 tgtatatgtt ctcctttgtt tttaaactaa gcactcaata aattattgat ggctgtaatt 12180  
 ttctgaaggt ttcaccggtt tcggcccgtg ctttataaat agcttcggca caaaagacaa 12240  
 aacgggtccct ccaacacata aatgggttag tttacgtttt cattatcttt ggtaaaatca 12300  
 agtccaccac gtagacactc ataacaaaag tttgaatate ctcagaaatt ttgacttgag 12360  
 tctatcttac ctttgatata ggacatccaa ccctccctcc ctccctgaac tttatattat 12420  
 tcatattaca cctgaacttt atattattca tattacaccc tgaagtgggt ttcatttaat 12480  
 tgcatacatg ctgaaatagt ttgacaacgt gagatgcaca aaatctacac gttcgtctta 12540  
 agttgcaatt cattttatcc cttttctttt tctctcttac ataggaatat caatagtact 12600  
 aattcacatt acaatatagt ataaattggg gatcgattat tggcaatata ctatattaaa 12660  
 tattcaaaac tagtcattta agctgccaaa taagtaaacc actatcgaaa accacaatat 12720  
 aaatggcatt acaaaaactta ggggggttgaa tatccaattt taaagttcat gatgctagag 12780  
 gaatttctat caaaagttta tgggtacata tggacttttt cttttttaa agaagctatt 12840  
 cttatcgtaa acgttaaata ttttttgtac tttatttttt atgattgaaa aaaaaactta 12900

gttttcaaaa tgattgggtct gtatacaagc atcaattaga ctttaataaat tcataataaca 12960  
gtttcctggc agaaactgta atttggtttt gttattagac tacgtttatt atttcaaagt 13020  
tgtgtacgta tatccgatgt gacaacccaaa cccaaaaaatt ttccctaact ccatgaggcc 13080  
ttacagatat atttgatggg tgtaaagttt ttttaagttct ttgggtgcaa agttttttaa 13140  
gtatacggac acacatttga agtattaaat atagacaaat aacaaaacat attacatatt 13200  
ctgcctgtaa acaacgagac aaatttatta agcctaatta atctgtcatt agcaaacgtt 13260  
tactgcagca tcacattgtc aaatcatagc gtaattagc tcaaaaatat tcgtctcgta 13320  
atttacetgc aaactgtgta attgggtttt tttttcgtca acatttaata ctccatgcat 13380  
gtccaaatat ttgatgcgat ctttttggcc aaattttgtt ggaatctaaa caaggatcaa 13440  
atttgcgtgaa tttttccaga cgtcacggct tgttcatcca tcgttcgcat cgcgattcgc 13500  
caccgacgcc ttggtttcca acgaatttta tcataccgctt aaatacatcc aaagctctcc 13560  
atcgccatcg gcggccaacg gcgaccgctc cgctctaccc aatccacca tccactcgcc 13620  
gccgccccct gatccaaagc ctccgccgcg ccgccgtcga gaggaggagg aggaggagga 13680  
ggaggaggag gaggcgtgag cccctatggg gaccctcctc cggccgcgct cgctcgccca 13740  
cgccgccggc gccggcgacg ccacgccgct gaccgcgcac ggtagccacg cgcctctcga 13800  
gagggcccc ccccgccgct cgctgatctc tcttctcate ctgtttgggt ttgggtttgt 13860  
gatttgggtg tttttttttt tccgcagcgg tgggtggtag cggtggccgc ggccgtggcg 13920  
tggagtgcc gccgcacggt gtgcgccgcc gcccggtcc gcaggttgcg gtggcgacgg 13980  
cgagctggag gaggcggagg gagaccgtgg tgagatcgga tttcgccgct ggtggtgccg 14040  
ctaccatggg ggattcgccg caggcgctct caggtttgca gcctctcca ctctcttctc 14100  
gcaaaatgtg ttgctatgtt cctctcgtg ggctggcctc atagccatta atgtagtttg 14160  
ctggaacatt acattcgga cgttggttgc aattgcttga caaaatgtgg aattgtggag 14220  
gggagaaaaa tcgtttgaac ctgcagtac aaaattgcca tctataattt taaaactgaa 14280  
ggtgtggaaa tcaaacataa tcattgccag cacatcattc ttgttaacca ccttgacata 14340  
ttgttggctt ataacagtta gctccacacc aacttggag gtgtcaatgg aatgtaagta 14400  
taaattgagg ataactggca gttgttaaga ctttctacag aacttgtagc agctaaaact 14460  
agctattgtg catttatgtt tcattggaatt tgagcggcaa tggatatttc ttactaagac 14520  
gtataatgca aaacaaaaaa aaaaaaaact atgtctatgc agtttacetg taatgtgcgg 14580  
atgcaaataa aatcatgttc atggacaaac taatgggatt cataccaaat tccagaattg 14640

catttcttat gtggttactt ttgtttgttg atttggttac cagacatcga tgtggtttca 14700  
agggtcagag gggtttgctt ctacgcgggtg actgcagttg cagcaatcct tttgtttgtc 14760  
gccatgggtg tggttcatcc acttgtgctc ctatttgacc gataccggag gagagctcag 14820  
cactacattg caaagatttg ggcaactctg acaatttcca tgttctacaa gcttgacgtc 14880  
gagggaatgg agaacctgcc accgaatagt agccctgctg tctatgttgc gaaccatcag 14940  
agtttcttgg atatctatac ccttctaact ctaggaaggt gtttcaagtt tataagcaag 15000  
acaagtatat ttatgttccc aattattgga tgggcaatgt atctcttagg agtaattcct 15060  
ttgcggcgta tggacagcag gagccagctg gtatggctgt agtctcatcc ctgctttctt 15120  
aagtagacat atatacattt acagtatttg gtaaataaac aagattttat gaatcatata 15180  
tgattttggg gaaaacacaa aactctcttt gttggctgcc ttgaacatag ttctgttcac 15240  
acagttatag caccttcttt aaaatgaaga actttgttgc atacacataa ggccaaacca 15300  
cataatgaat tttgtttatt tctatctttg aatgttagca tcgtttttgt ttaatgcatg 15360  
atgccttcc tatatatattg tagtatgtca acattgtatt ccatgctgag cataacaaat 15420  
ggtttgtaa aattcaggac tgtcttaaac ggtgtgtgga tttggtgaaa aaaggagcat 15480  
ctgtattttt ctttccagag gggactagaa gcaaagatgg aaagctaggt gcatttaagg 15540  
ttcagtaacc aaacttaggt tacattacat ctaatgagat ttttatattc agtatataat 15600  
gttaaccttc tcatgggtga ctgacgtggt tataaatgtc cccagagagg tgcattcagt 15660  
gtggctacaa agaccgggtgc tcctgtgata cctattactc ttctcgggac agggaaactg 15720  
atgccttctg gaatggaagg catccttaat tcaggttcag taaagctcat tattcaccat 15780  
ccaattgaag ggaatgatgc tgagaaatta tgttctgaag caaggaaggt gatagctgac 15840  
actcttattc taaacggtta tggagtgcac taaagaaaga tgggtgtttt ttttattata 15900  
tggaacctat tcaaaggcac agacaggctt tcaaggctaa gcttgttaca ggtactgata 15960  
ctagttacta attactttcg taatcagtat aaataagctt gtgtagtgta atggcattgt 16020  
acatttctgc acttggtaaa ttacagaag aggcaagtaa tatttttagag gattgagttt 16080  
attcaccacg tcatatagtt gaagaggcaa gtaacctgta agagaggact gaacattaac 16140  
acctcttggt cgattaaaaa tgaccaaaga gcatcaaaca tgtattcgag gctgttactt 16200  
tagatatggc ccattaattt gtttagttgt ctatgtacat cctagttggt gtaaatagcca 16260  
gttaccattt ctatgatcta aaacaatcaa ctcttttagt atattttcaa aaacgaaaat 16320  
tcagtacaca tgtatgaate ttaatattct tctctagctc gttacaaaag caacaaaggc 16380

accgtgtcag ctggttcaca ttagctagtt tgtacttagc attatccact agcaccttat 16440  
tttcatgcat atcatgctaa tttgcttgcc cacgttgagt gggaatTTTT ttcattgttt 16500  
ataatttata tatgttttag acttctagtc cacaatttat gtacttcatg ttcctgagcc 16560  
tctagtatgg ctgatagcag actaggtgct gagtgctgtc cttttttgca gactgaagag 16620  
agaagaaata caagactgtc cattgttagt cagatttgta aaaatagact ctgatgtagt 16680  
ttacttttgc ccctatttta tttttaacaa tacaaatata taacagatcc taagaactta 16740  
tcttaattta ggagaagttg ctctgttcat taaattaaat tgtgaagtaa aaatgtgtgc 16800  
tcgagtctgt caatgcaatc ctgtgttctt gtttgaagat atgggtgtagg gcaggccagg 16860  
attgaacact gaatggtaag actgcttctg ccttcagacg ttattgctaa attttttagct 16920  
acttgcagtt agtgctgcc a cccgattaa gcagtagaac aaagtagttt tgtcgtgcac 16980  
aaatgagtta tatttcattg gaaatcgaag cgaaaacgaa tcaaaaagta gaagaaaagg 17040  
ggaaacttgg taattactcc ataaagagag tgcattttat tggtaagatg gtatccggaa 17100  
gctgtgagct cggggctgta tgtattctgg caaatttgat atgagatgct cgattattgg 17160  
cttaagttag cgatatcaaa tttggggaag caccaaagga attattgtga aggagttag 17220  
gggtcgtgac gttatctgct aggttcaaat ccttgtggct atgaatatTT atctgctagg 17280  
ttcaaatcct agtgactatg aatattaatg ggtaaggtaa gggatttatt gttaatttta 17340  
gtttctttta gattgtgcc t cggacgcca ttcggtaact gtaataatgc tttgtattgg 17400  
attcacttgt gttacatgca cgcactaaac atgtgcttta ccttttcac tgtttttgcg 17460  
ttctgggcta gaaactcaaa cgttgaattt tccatggctt gctcaacttg acaattactg 17520  
cgtgtcaagc gatcttatac gcatactatg cgcacaagtg attgtatacg gatatgatga 17580  
cagtataacg tgtgatattg atttttttta taaaaaatg atgttccttt ccttgatgaa 17640  
ggaacaaaga ctttttttta aagaagggtta ttactaaaaa caaaaatgac aaaaacaaaa 17700  
tatcagtgca catggcaagt gtgctcggca attttttctc tgtactttta acaaaaatac 17760  
ttctatatgt tcttttttat aagggtggca caaatctttt aaatgagcca aatatctaca 17820  
ttggatttat taaaaactgt ataaattata atttatactc tgaaagggtg tgtgcatctc 17880  
tcttggagaa aatgtataag ttgcaaaca acattaatcc acgttatgta actttttttc 17940  
gccggaaagg ccgaaggagg cctgacggag cgtggggctc ctcaccggga gaccgcgcag 18000  
gcccccttt gccggttcgg ccggggactc agggtgaaat tctaagctct ctgtatgtgg 18060  
aagggtcgcg accgtcgaaa gagcataaga cacgggcgat gtatacaggt t cgggccgct 18120



gagaagcgta atacctact cctgtgtttt ggggggatct gtgtatgaag gagctacaaa 18180  
gtatgagcca gcctctccct tgttctgggt tccgaatctg gaaaagtcca gtccagtccc 18240  
cccctctaag tgggcaaggt cctcctttta tatcttaagg ggataccaca tgcaccatct 18300  
ccctcctttc tgtggggact taccctacct ttccataaat ggacggagat ttgtatagtt 18360  
gccgtccgaa tgaccttctg ataggacggc ccataacctac ctccacttcc gccgaaagca 18420  
ggtgcgacgt gggattatgg ctgtctgctg acgacatgac cagtgtcaga ctggtcacaa 18480  
attgctcatt cctgtccacc acgctcaggt ttagcaatct acatgttggc ccttcttcac 18540  
acaacatctt gcctgtaatg gttaggatga agcctggcat atatctaacc aggactaacg 18600  
tgccatctct aggaggtaac acgctagctc cagctgggga cgagcgcta gaagccctcg 18660  
tcctgacggg atggggcgag gcgtgctga gatcgctgt cgccaccta cccgcgatct 18720  
gaccggtctg tgactggtea cagaccggat aaacgagtgc actgcacttc gttacatgcc 18780  
gcgtgacacg ctacgcaaaa ccgcaataaa tgtgggttagg tgagccccgc tgtgctcacc 18840  
taaccatac acgcggagca aaaaccacg aggggtcggg gcgcctcggc cctcggggcc 18900  
gaggcgggtg cggtcggacc ccctcggggg gactaagagg agggcgaaca catcacctc 18960  
gggccccgacg tccccgagg gtgccaggcc acgtgggcga ttgtgtctgc ctcaaactc 19020  
tagtcatgat actcctgatc ccatgtcacc gacagtagcc cccggcgta tgccagggag 19080  
atcgccctct ttaagggaag cggtcgggag tgacgccact cctaaggcct ggtgacaggt 19140  
gggaccggtc tccacaattg ggcagaaacc caacggtcac aaatcacgca catcggcaat 19200  
ggtaactcta ctatcaataa tgagcggctc cttcaagact gccacattac tcgagtagca 19260  
cacgaatctg gacatggcga ttcgtttcgt ctggagatat ggtaacgtcg ctttggtcgg 19320  
cgagcgtaat taacgcgcgc acgatatgat ctatctcgac tgccacaacc gcatatccac 19380  
ctcatgcgcc gcaagcgggc gaatgggatt agtggaaagc tgggcgcgag aaacgagggg 19440  
gcgaaatagt gggcgcgaga agcagaggag cgggcacagc gttggcaaga gtataaaggc 19500  
actgaggaaa ggatctgttt ccttcctttc gccatcattt cccttgtctt cgccgcttgc 19560  
gccetaactc cttctttcct gtgctctact ttcgccacac gcgctcgctc tcaatcttct 19620  
cttcctccgg cgccatggca cggggctccg ctctgctcga tggtagcgtg ctgccgcctt 19680  
cccgcacgtg gagegagagg caggtcgggc tgccgcgcgc cttcatgccg gaatctgcca 19740  
ccggccggga gatagtcacg ctgggtgagg gacgcccggc gccagactac ccggggcggt 19800  
ccgtcttctt tctccccttt gcaatggcag ggctggttcc gccattttct tctttcttca 19860

tggatgttct gaagttctac gatctccaga tggcgcacct ccccccaac gcggtgatga 19920  
cattggccat cttcgcgcac ctgtgcgaga tgttcattgg ggtgcgcca tctcttcggc 19980  
tgttccggtg gttcttcacc gtgcagtcgg tgtcgccc atcggtagtt ggtggctgct 20040  
acttcagcc atgggggccc gtgctgaatc gctacatccc ctgcgccctc cgcaagaagt 20100  
gggacgactg gaagagcgac tggttctaca cccccctcgc cgacgaagcg cgctctgac 20160  
ttccgagcca gccccggcg caggcctcca gctggcgggc gccggtagat ctgggggatg 20220  
gctatgacgc cgtcctcgac cgcttgccg gcctacgac ccaggggctc acaggggcca 20280  
tggtgtacgg cgactacctc cgtcgtcgga ttgcgccgct ccagcggcgc gctcggggcg 20340  
cctgggagta caccgggtcc gaagactaca tgaggacca ccagggagtc agatgggact 20400  
gggctcctga ggatttcaag atagtgggtc aacgggtgct gaatctcaac tccatggagg 20460  
cgtccctcat tcccaagga atcctccctc tctgcagcga tccagaccgc gcctccatcc 20520  
tgaccattat gacggcggtc ggggcctcag aggagtgagc tccaaagggc cacgacggcg 20580  
caggcgggag ccgtaggggg gatcaatcta ccccgggagg gggtcgtgct tctgggtctc 20640  
gcgacggagg cccgaggagc agccgccctg ccgacgccc ggggaagagg aagcagggag 20700  
gaacacctcc cccatctcct ccccgagggg gcggggcggt gcgtgccaac agcaggcgcc 20760  
cggagggggc cgcgccgaca tcgcagccc aggggggagcg caagaagaag cggtccgca 20820  
agatggggga gacagaacca tctcggggaa accttatttc cctccaaag tggtcgttta 20880  
accgaccccc tcgcagggtc gtctctcacc catcgtggct gtattcattc tctcaacgcg 20940  
agtttttact caccatctt gtctgtcttc tggctctttt ttctgtttca gcgagatccc 21000  
gtcgcgtccc tcccgccatt ccaagtccgg ccagtctgag gccgaggatc cggcggccgc 21060  
agaggccccg aggcgggaat ctgaccggcg agaggccgc gatcgcctac gggaagccga 21120  
ggaggccgcc caggaggccg cccgggctcg ccagggcgag gaaaccgctc gggaggaggc 21180  
cgcccgggcc cgccaggccg aggaagccgc tcgggaggag gccgcccag cccaccaggc 21240  
cgagggaagc gctcgggaga aagccggatt tcgccaggac gaggcaatgg cgacttccga 21300  
ggcagctcgc gatgaggctc cgggcgcgctc gcttgagccc gcttcctcgg gcgacgctca 21360  
ggcgacaact tccggggcag ctggcgacga ggctgcgggc gcgtcgcttg ggcccactcc 21420  
ctcaggcgac gcccaggacc aaccaggctc gagggacatc cccaggtccg gcacttccat 21480  
cggcggcccc agccgcgtgg catcctctcc aaggcggctc tccccacgc cttctatcgc 21540  
cccgtgagc gcagagcccc ttctgcaggc cttggccgcc gcaaaccatc cggtgttgga 21600

cgggcttagt gccaggtgg aggccctgca agcagagtgg gcggagctcg acgccgcgtg 21660  
ggcgcgtgtc gaggaggggc ggcgctcagt ggaggccatg gtggaggtgg gccgcaaggc 21720  
acaccgccgg catgtctcgg agcttgaagc ccgtaagaag gtgttggcgg aaatcgccaa 21780  
ggaagtggag gaggagcggg gggctgccct cattgccacc agcgtgatga acgaggcgca 21840  
ggacaccctc cgccttcaat acgggagctg ggaggcggag ctagggaaaa agctcgacgc 21900  
cgcccagggg gtgcttgacg ttgccgctgc ccgagaacag cgggcggggg agaccgaagc 21960  
ggcgctccga cggcgcggaag agacccttga ggcgcgcgcc atggcgctgg aagagcgcg 22020  
ctgcgtcgtg gagagggatc tggcggaccg cgaggccgcc gtcactatcc gggaggcaac 22080  
actggcggcg cacgagtccg cctgtgccga agaggagtcc gcactccgcc tccacgagga 22140  
cgcgctcacc gagcgggagc gagctctcga ggaggccgag gccgcggcgc aacggctggc 22200  
ggacagcctg tccctccgcg aggcagcgca ggaggagcag gcgcgccgca ctctggaatg 22260  
tgtccgcgcc gagaggaccg cactaaacca gcgggccgct gacctcgagg cgcgggagaa 22320  
ggagctggac gcgagggcgc gcagcggcgg ggcggctgcg ggcgaaaacg acttagccgc 22380  
ccgcctcgct gctgccgaac ataccatcgc cgatctgcag ggcacgctaa actcgtccgc 22440  
cggggaggtc gaggccctcc gcttggcagg cgaggtaggg cccggcatgc tttgggacgc 22500  
cgtctccgc ctagatcgcg ccggtcggca ggtgggcctc tggagagggc ggaccgtaaa 22560  
gtacgccgcc aaccatggag gcctcgccca gcgcctctcg aagatggccg gggctctcca 22620  
acggctcccc gaggagctcg agaagacaat taagtcatcc tcgagggacc tcgcccagg 22680  
agcgggtggag ctctactagg cgagttacca ggccagggac cccaatttct ctccatggat 22740  
ggcgctggat gagttccctc ctgggaccga ggacagcgcg cgcgcaggtc cgggatgccg 22800  
ccgaccatat cgtccacagc ttcgagggtc cagcccctcg gctcgcgttc gcccccaact 22860  
ccgacgagga ggacaatgcc ggtgggtgcag acgacagtga cgatgaggcc ggcgacccgg 22920  
gcgtatcgga ttgatcccc aagccccgc cattcttcag ttttttcttc ttttcttct 22980  
tctaaggcct tcgggcctct tttttgtata gatcaactta atctgtaatc aaaaatgaag 23040  
aaatttttgt gtcaatttca tcttgctgtg tgtatgagat gaggatgatc tgtgacgtgg 23100  
tccttttgcg tcttagcttg attaagggtc cgtgcccgagg tcccagtcct caaaaggcgt 23160  
gggtcggggc tagtgccctg ggagatccac atgtcgagac tggccaggcc gggaacgtgg 23220  
tgaccgaggg ttatgggtga cccgattgtg ggtttttgcc gattcccccc cggagttcac 23280  
cacgccccgg ggcacggctc ggttctgggc cccgtttggc gattttagcc gacccgagcc 23340

cccgagggca ggattgagca cgagtgacct atttcaagtc aagattcttc aaaaggaaaa 23400  
aaaaacacag atacagcctt taggaaattg aaactgcttt tattgaaata ctgaaataag 23460  
agaaataaga atgtgcatgt gtggcagccc cgggccaacc ctgcacgccc gagggggtgc 23520  
ggggttggcc cgagcccgaa acctgacacc cgaccccccc cctcaggggt agaagcgacg 23580  
aaggtgttcg atgttccacg ggtaggcag ctcaatgccg tcgcccgtgg ccagccgtat 23640  
ggagcccggc cgggggacgc cgaccactcg atacggaccc tcccacattg gtgagagctt 23700  
gctcaatcca gcacgcgttt ggacgcggcg taggacgagg tcgtcgacgc agagtgatcg 23760  
ggcccggacg tgacgtgat ggtagcgccg caggctctgc tggtagcgcg cggctctgag 23820  
ggccgcgcgt cgccttcgct ctccaagta gtcgaggtea tctctgcgaa gctgatcttg 23880  
atcagcctcg cagtacatgg tggcccagg agacctcagg gtgagctcgg atgggagaac 23940  
cgcttccgcg cgtagacga ggaagaaagg cgtttccccg gttgctcggc ttggtgtagt 24000  
tcggtttgcc cagagcaccg ctggcaactc ctcgatccat gaatcgccgt gcttcttgag 24060  
tatgttgaag gtcttggttt taaggccttt gaggatttct gaattggcgc gctccacttg 24120  
gccattgctt ctgggggtggg caggtgaggc gaagcagagc ttgatgcca tgtcttcgca 24180  
gtagtcgccg aagagttcac tagtgaattg ggtgccatta tccgtaataa tacgggttagg 24240  
cactccaaac cgggccgtga tgcccttaat gaatttaagt gcggagtgt tctgatctt 24300  
gacgaccgga taagcctcgg gccacttagt gaacttgtcg atcgcgacat acagatactc 24360  
aaacccgccc ggggcccgc taaacgggtc caggatatcg agccccaga cagcaaattg 24420  
ccacgaaagt ggtatggtct gcagggcctg ggccggctga tggatttgct tggcgtggaa 24480  
ttgacacgct ctacatcgcc ggaccaggtc gaccgcatca ttgagagctg tcggccaata 24540  
gaaaccctgg cgaaaagctt taccaaccaa ggtgcgcgag gcggagtggg ctccgcattc 24600  
gccttcatgg atatcggcaa gaagcacaac gccttgttcc cgaggaatgc acttcaggag 24660  
gattccatta gccgcgcgcc gatagagggt cccttctacc agcacgtagc gtttgagat 24720  
gcgatggacg cgttcactcc cttecggtc ctcgggtaaa gtcttatctg tgaggtatgc 24780  
ttgatctcg gcaatccaag caatcaatct aaggagctg ggagcgctcc cctcgggtcc 24840  
cgaggcctgg acttcaacgg gcctcggggg ccggtcaggc gcgtccgtct cccctaaggg 24900  
gtcgggtcgc gccgacggt gggcaagcct ttcttcaaag gcgcccggtg ggggtctgggc 24960  
tcgcgtggac gcgagccgtg agagttcgtc ggcaatcatg ttatcccgtc tgggcacatg 25020  
ccgaagctca atcccgtaa aatggcgctc catacgccgt acttggcgca cgtaggcgtc 25080

catctgcggg tcagagcacc ggtactcctt acagacttgg ttaacgacca gctgggagtc 25140  
gcctaacacc aggaggcggc ggatccccag tccagctgcc actctgagtc cggcaaggag 25200  
tccctcgtac tctgccatat tgttggtcgc tcgaaagtcg aggcggacca agtatctgag 25260  
gacgtctccg ctcggagagg tcaacgtgac ccccgccaccg gcgccctgaa gagacaggga 25320  
gccgtcgaac tgcattaccc agtgggcggt gtgaggcagc tgcgaggggt ccgtgctggc 25380  
ctcggggatt gagacgggct cgggagccgg ggtccactct gccacaaaat cggcgagagc 25440  
ctggctcttg atagcgtggc gtggttcaaa gtgcaaatcg aactcagaaa gttcgattgc 25500  
ccatttcacc acccgtcctg taccgtctcg attatgcaag atttgaccga gggggtaaga 25560  
cgtaaccaca gtgacccgat gcgcctggaa ataatggcgc agtttcctcg aggccatcag 25620  
aatagcgtaa agcatcttct gggcctgagg gtatcggggt ttggcgtccc ggagggcctc 25680  
actaacaag tagacgggcc gctgcacctt tcgggtgggc cgatcctctt cgctaggggc 25740  
cgcatccctg gggcactctt cgtccaagca gcctcgcggg gcgcacttgt cttctgtgct 25800  
gatgacctcg gggtcggagg ataacagggg cggccttccc acagtggctt tggggccgctc 25860  
ctgggggtca ggggctcctg gcgtcgtcgg acaagcgggc aaagggccaa ctccggtcgt 25920  
caggggcctt aggcctccgt tcggctcggg ggcctcttct ccctgctctt tcccgggtcg 25980  
agtcagcaca gggttagcct cgggggtcaaa gggcgatagg tgcggccttc ccacagtggc 26040  
ctcagggcct tcctgggggt cgggggctcc tagcaccgtc tgacaagcgg gcagagggcc 26100  
aactccggtc gtcgggggcc tcgggccacc gttcggctcg ggggcctctc ctccctgctc 26160  
tctcccgggc caagtcggca cagggtgggg aagcgcgaaa tgagaattgt cctcatcgcg 26220  
ctccacaacc aatgccgcac taactacttg cggggctgcc gctaagtaga gtagcaaggg 26280  
ctcgtctggc tccggggcga ccagaactgg gggagagctt agatagcct tcaactgggt 26340  
gagggcattt tcagcttctt tcgtccaggt aaacgggtccg gagcgtttga gaagcttaaa 26400  
taagggtaac gccttctctc ccagcctcga tatgaaccga cttagggcgg ccatgcaacc 26460  
ggtgacgtat tgcacatccc taagtttgct gggggggcgc atccgctcta tagcccgtat 26520  
cttctcgggg ttggcctcaa tgccccgggc agagaccaag aacccgagaa gcttgcccg 26580  
aggtacaccg aacacacact tatcgggggt taatitttatg cgggcggagc ggagactctc 26640  
aaaagtttcc gctagatcta tgagtaacgt ttcttggttg cgcgtcttta caaccaagtc 26700  
atcgacataa gcttcaatat tacgtcctaa ttggctacce aaagaaattc gagtagtacg 26760  
ttgaaaagta ggacctgcat tctttaaccc gaagggcatt gtcgtataac aataggttcc 26820

tatgggggta atgaacgcag ttttttcctc atcctcccta gccatgcgaa tctgatggta 26880  
accagagtat gcatctagaa aacacaaaag gtcgcacccc gcagtggagt cgacaatctg 26940  
atctatgcga ggcaggggggt aaggatcctt aggacatgcc ttgttaaggt cgggtgtagtc 27000  
gatgcacatc cgaagcttgc cgttcgcctt gggaacgacc accgggttcg ctagccactc 27060  
ggcgggggttg acgctgccat cataattttc ggcgatgggt ggccggaacc ttggggggcca 27120  
acggacattc cgaagactcg ccacaaaggc tctacagccg acaccaccaa ccggggggcac 27180  
ggagggctga ttcccgcgtc cgtgttgagg tgacactctg gacgaggaag cgccctccgt 27240  
tgcgtgggca gcacttcggt cattacgccg gcgctcgatg ctgggtgcggg cgtccggccc 27300  
cccacgcaga tctttctggg tcgaaggagt cgacgaagga gtggcgggcg aatggcgaac 27360  
agcggctgcc gctcgtcgtg cctccgtctt tgacgacgcg gagccggtgg tagcagcacc 27420  
agaggccttg gtggcgagg accgccacc agcatctagg cgctgccgta ccgtcatgac 27480  
taatttgcc acgtcgtcca gccatcgttg ggctggagac tccgggtcag ggacgacagg 27540  
cgggtgacgt aagagcgcgc ccgcagcttg gagcgcgccc tggggcgtgc tgccgtcgcc 27600  
gtagacgagg aggcgacgt ccccatctcg ccgttcttct ccatcgcccg cgatcggtga 27660  
agtcgcggat ctttcgaccc tctcgagcgc ctccccccgc ttaggacttt ggctggagg 27720  
gagcgggtga gtacgagtc gacggcgtgg gttcggctcc ccgtcgtcgc cactcacact 27780  
cggagagagg tcgtgcgcct ttgcttgctc ggccatcagg ctgaacagga aaagcttggc 27840  
gcacacggaa gagtacgaga gctcagaaaa acacacactg agtcccctac ctggcgcgcc 27900  
agatgacgga gcgtggggct cctcaccggg agaccgcga ggccccctt tgccggttcg 27960  
gccggggact cagggtgaaa ttctaagtc tctgtatgtg gaaggttcgc gaccgtcgaa 28020  
agagcataag acacgggcga tgtatacagg ttcgggccgc tgagaagcgt aataccctac 28080  
tcctgtgttt tggggggatc tgtgtatgaa ggagctacaa agtatgagcc agcctctccc 28140  
ttgttctggg ttccgaatct ggaaaagtcc agtccagtc cccctctaa gtgggcaagg 28200  
tcctcctttt atatcttaag gggataccac atgcaccatc tccctcctt ctgtggggac 28260  
ttaccctacc ttttcataaa tggacggaga tttgtatagt tgccgtccga atgaccttct 28320  
gataggacgg ccataccta cctccacttc cgccgaaagc aggtgcgacg tgggattatg 28380  
gctgtctgct gacgacatga ccagtgtcag actggtcaca aattgctcat tcctgtccac 28440  
cacgcgtcag tttagcaatc tacatgttgg cccttcttca cacaacatct tgccgtgtaat 28500  
ggttaggatg aagcctggca tataatctaac caggactaac gtgccatctc taggaggtaa 28560

cacgctagct ccagctgggg acgagcgcct agaagccctc gtcctgacgg gatggggcga 28620  
ggcgtgcgtc agatcgccctg tcgccaccta acccgcgatc tgaccgggtct gtgactggtc 28680  
acagaccgga taaacgagtg cactgcactt cgttacatgc ggcgtgacac gctcagccaa 28740  
accgcaataa atgtgggttag gtgagccccg ctgtgctcac ctaaccata cacgcggagc 28800  
aaaaaccac gaggggtcgg ggcgcctcgg cctcgggggc cgaggcgggt gcggtccgac 28860  
cccctcgggg ggactaagag gagggcgaac acatcacct cgggcccgcac gtcccccgag 28920  
ggtgccaggc cacgtgggcg attgtgtctg cctcaaact ctagtcatga tactcctgat 28980  
cccatgtcat cgacaaggcc atccgaatgt attaaggagt aaaagttaca agaaaaaaca 29040  
ccacaatgca ccaaggtgca tgaccacaca ccatacacta cccccaagca caaaccactg 29100  
agggtgaagc ctagcaccaa acgaccgcca ctaagtgtga ccaaacgccg ctaggcctac 29160  
ggcagcaaca catagatgag acttcgaaaa cgatgccacc aagggtgtca cgacatgtag 29220  
gatgctgcca tcgtccatct aaaaagatgt ggttttcacc cagagaaact catcaagaag 29280  
gggagagggt aacccttgac agcgcccaa ggaggttacg acgcccgaag gcgtagccgc 29340  
tgccgggtccg gtgaaccacc ggactaggct tccgcctagg accctatagc cttgatcgca 29400  
gatcacgctc caccactcag aaccaccaca cagacaaaag gtagcacgta gcttccaccg 29460  
caccgcaccg acgccccttc gtcggccgac tccatcgaac caccatccct gagagctggc 29520  
ccaggacccc tccgttccac caccgcggg ccgccttgcc agttttggcc aaaggagaac 29580  
ccgggactgg gtgacattgc ttcggcagcc tgagcttccc ccgctggcga gctgctgtct 29640  
caatccaacc tagaaactcc ccgcaaaaga aggggatgag ctctaggaag ggcgagggtg 29700  
ccgaccggca acgaggaaga caaccatcg actccagctc cctttgact accatctggg 29760  
cctgcgcaa tgccggatac gctgtcgtc cggtccggc gccaccacc tgcacccct 29820  
ttgcctggtc tccgcgcccc tcctggctgc gtcgcgccgc ccagctggcc gctaagggca 29880  
ccacgacggc cgcccggcta ccgaggcctg gccgcgccat gggacagctc gcgctggcac 29940  
cagcgagcca cggccgtcgc gctgttgccg gcgccagcga gcacaaccgc cagctccaag 30000  
ggccgagcat gccactgagc cgccgccgt gccgcccggg ccggctgcac gtcaccggcg 30060  
cacacgaccg cacgccgcca cgctccgcct ccgcgccga ggcagcccca tgccattgcc 30120  
gcgcacctcg ccgcccgt gccgagccgc caccgcgcac cttgctgagc cgccaccgcc 30180  
gtccctagcc gcctcgtgcc gccgccacgc cagatccagg cgcgggatgg ccggatccgg 30240  
ccttgggggc gccggatccg ccgcctcccc acaccgccac ggcgtcacca cctccgaccg 30300

cagtgagggc ttcgtcgttt gccccatcct catcgcgctcg aggaggaaga cgccaagaaa 30360  
aaagggcctc gccgctgcct tccttgctcg ctgccggctt cgccgccggc gagctccggc 30420  
ggcggcgagg tgggggagaa gaagtgggga gtgggcagct aggggttttt cgcccccaa 30480  
gccgcccgtg cgagagcgac ggtggggggg gggggacttt ccaacctctt ccagtgttct 30540  
agttctccac gttatgtaac tcaatttggt taaccataga aagtaagaaa cctaccagcg 30600  
tgttaagctc tctttcattc cctttcttct tcctggtttt gcttccatca catgtcaagt 30660  
gaagggttct taactacat tactcctaca catctaattt ttttctcaga tctttcgcag 30720  
gtatatattg atgctacatt ttatgatctt aagataatct ccttcacatt accctctgct 30780  
gaaactttag cttgaaccgt catcttcacc acaatttgag cccaatttgc acagagcaca 30840  
acgagcaata gcttgccctt acgttcatta tttagcatga actactacta actaccaag 30900  
aatcaataca cgggtttaat aacgccattt tatcacgtta atatatgttt cattcaacac 30960  
accggttttg gcacagttgc aaacttgcaa taaattcttt cctacttctc catcccataa 31020  
tataacaaat tggatatgtc cgtctggtac taagttgcta tattatgaga tggagggagc 31080  
acttcttttc ttccaaaata taagaatata gtattggatt agatattatc tagattcacg 31140  
aattcgatta gggtgtctag atttatagtt gtatgtaatg tataattcgg taataggtta 31200  
ttacctctcg ggatggaggg agtagttttg actttttttt ttcttataaa tcgctttgat 31260  
ttttatatta gtcaaathtt atcgagttta actaagttta tagaaaaaaa ttagcaacat 31320  
ttaagcacca cactagtttc attaaattta gcatggaata tattttgata atatatgtgt 31380  
tctgtgttaa aaatgctgct atatttttct ataaacgtag tcaaatttaa ataagttaga 31440  
ctaaaaaaaa tcaaacgcac ttataatatg aaatggagga agtagtagac tataacaaat 31500  
ttaaaccgtg ctttgatttt agagcatcac taatatgtta gcaataatct atccctaaaa 31560  
tttatttttt ttctaaact gaaaatagga agtggaata ctctccatc taagagagag 31620  
cctaaattca ataaaaaact aaaaaactaa aggtggatcc ctctattaaa ctaccgcaa 31680  
aaatttatgt tttttttctc ttccacgcgc gcagaacaga tatctcgatc aagttagcat 31740  
gtaaaatttt taaagagata ccttatacga ctcttccgt atttccaaaa gcaaaccgat 31800  
ttaaaatctg actcaaataa agatctatat atccaattta catgacacat gtttcgccga 31860  
atttttatat taataataat taatattttt aaaattaaat tattagcaat ttgtttggag 31920  
gatttatcaa aacaggatgg acgttgttta taacagcgtc tagacctaga cgcgcttgca 31980  
aactgcggcc acccttttat cacacaaatt ttgacaatt tgacacttcc caaaaattaa 32040



ttttataaat taaccgtgac caaaacttat ttaaaaataa tctttttgtt gagcgcaaaa 32100  
tcgtataactt cagegccaaa tagcacggcg ccgacctccc ccttcccctc ccctctatcc 32160  
tccactgctg ccgccacact ctccgtatca gctgcgtcgc gttgggtttcc gccggcgctg 32220  
ctgctgctgc accagtccgc tagggcgggc gggcatggcg cgccgcgccg cttcccgcgt 32280  
ccgcgccggc gctgttggcg cccttcgctc ggagggctcg acccaagggc gagggggccg 32340  
cacggggggc agtggcgccg aggacgcacg ccacgtgttc gacgaattgc tccggcggtg 32400  
cagggggcgc tcgatctacg gcttgaactg cgccttcgcc gacgtcgcgc gtcacagccc 32460  
cgcgccgcc gtgtcccgt acaaccgcag ggcccagacc ggccgccgacg aggttaactcc 32520  
caacttgctg acctacggca ttctcatcgg ttcttgctgc tgcgcgggcc gcttggacct 32580  
cggtttcgcg gccttgggca atgtcattaa gaagggattt agagtggacg ccatcgcctt 32640  
cactcctctg ctcaagggcc tctgtgctga caagaggacg agcgacgcaa tggacatagt 32700  
gctccgcaga atgaccagc ttggctgcat accaaatgtc ttctcctaca atattcttct 32760  
caaggggctg tgtgatgaga acagaagcca agaagctctc gagctgctcc aaatgatgcc 32820  
tgatgatgga ggtgactgcc cacctgatgt ggtgtcgtat accactgtca tcaatggctt 32880  
cttcaaggag ggggatctgg acaaagctta cggtagacac catgaaatgc tggaccgggg 32940  
gattttacca aatgttgta cctacagctc tattattgct gcgttatgca aggtcaagc 33000  
tatggacaaa gccatggagg tacttaccag catgggttaag aatgggtgtca tgcctaattg 33060  
caggacgtat aatagtatcg tgcatgggta ttgctcttca gggcagccga aagaggctat 33120  
tggatttctc aaaaagatgc acagtgatgg tgtcgaaacca gatgttgta cttataactc 33180  
gctcatggat tatctttgca agaacggaag atgcacggaa gctagaaaga tgttcgattc 33240  
tatgaccaag aggggcctaa agcctgaaat tactacctat ggtaccctgc ttcaggggta 33300  
tgctacaaa ggagcccttg ttgagatgca tgggtctctg gatttgatgg tacgaaacgg 33360  
tateccacct aatcattatg ttttcagcat tctaatatgt gcatacgcta aacaagggaa 33420  
agtagatcag gcaatgcttg tgttcagcaa aatgaggcag caaggattga atccggatac 33480  
agtgacctat ggaacagtta taggcatact ttgcaagtca ggcagagtag aagatgctat 33540  
gcgttatttt gagcagatga tcgatgaaag actaagccct ggcaacattg tttataactc 33600  
cctaattcat agtctctgta tctttgacaa atgggacaag gctaaagagt taattcttga 33660  
aatgttggat cgaggcatct gtctggacac tattttcttt aattcaataa ttgacagtca 33720  
ttgcaaagaa gggagggtta tagaatctga aaaactcttt gacctgatgg tacgtattgg 33780

tgtgaagccc gatatacatta cgtacagtac tctcatcgat ggatattgct tggcaggtaa 33840  
gatggatgaa gcaacgaagt tacttgccag catgggtctca gttggaatga aacctgattg 33900  
tgttacatat aatactttga ttaatggcta ctgtaaaatt agcaggatgg aagatgcgtt 33960  
agttcttttt agggagatgg agagcagtgg tgtttagtcct gatattatta cgtataatat 34020  
aattctgcaa ggtttatttc aaaccagaag aactgctgct gcaaaagaac tctatgtcgg 34080  
gattaccgaa agtggaacgc agcttgaact tagcacatac aacataatcc ttcattgggct 34140  
ttgcaaaaac aatctcactg acgaggcact tcgaatgttt cagaacctat gtttgacgga 34200  
tttacagctg gagactagga cttttaacat tatgattggg gcattgctta aagttggcag 34260  
aaatgatgaa gccaaaggatt tgtttgcagc tctctcggct aacggtttag tgccagatgt 34320  
taggacctac agtttaatgg cagaaaatct tatagagcag gggttgctag aagaattgga 34380  
tgatctatth ctttcaatgg aggagaatgg ctgtactgcc aactcccga tgctaaattc 34440  
cattgttagg aaactgttac agaggggtga tataaccagg gctggcactt acctgttcat 34500  
gattgatgag aagcacttct cctcgaagc atccactgct tccttgthtt tagatctthtt 34560  
gtctggggga aaatatcaag aatatcatag gtttctcctt gaaaaatata agtcctthtt 34620  
agaatctthg agctgtgaa gcctthtgca gctthgaaat tctgtgttg agttctthtt 34680  
tcctacagtt gtattagagg agggatcttc tctthtatgtg taaatagcga ggtatgtatg 34740  
tcacctctcc gaattatthtt tactctggth cctagacggt aaacaagcaa ttatgttctg 34800  
cctthgatgc cagaaaaaac acaaaagtht gtcgthtct ctactaacgg atcataaagg 34860  
aatthgtaac tggagthtca aacttaatth gtctaggcag tagthttggc attagatcca 34920  
acattgtgta ggattcattt gtgtgtatca atctataggg thtcattaaa thtcgttaat 34980  
gtgtactgth taggtgttga atagthtgac thgtththta actgaacaaa agatactgaa 35040  
atcgthccat tcaacaacaa catgttccgt taatgaaatt attgtacgth acctthtgth 35100  
thcttactca caagtgtcct cththcttht atctataga thgttacaac aaattatthga 35160  
thcaatthtg gththgaaca thgatgatcc tccctgcact attggtgcag ctgctcttht 35220  
atthcatthg tgaagtgatg tgagtacctc tcaatcccat ccttatgctt ctgtgcatgc 35280  
thcatthcaa thththtacgc atatcgattg ththctthta tataacagtc cataaagata 35340  
atcacatcat gacaaagtha thththctta cagtatagth atataagtat tcaccagtht 35400  
tccatgaata ththtgcatg tgattacaaa gaagattatt tgagaaaatc catgctthta 35460  
ththcattht thgtthgaag thgaacttht atthtatgthg taaatthcag ththattthg 35520

tagcagctcg tactctttaa tgggtataact tcacttgtgc ttattctcca atatctccct 35580  
tcttgttggt caggttcaag aaaatcattt gttggattca gaatctgggtg tccattttct 35640  
tcttaaatta ttaaatectc cagtgaatct tgttgattcc aaagcaccat cgatagggtc 35700  
caaacttctt ggaatcagta aagttcaa at gcttaatgga tcaaataagg attctgactg 35760  
catttcagag gaaatccttt caaaagtga agagattctc ttaagctgtc aagtgatcaa 35820  
gtcgctcgac aaagatgaca agaaaacaac aaggccagaa ctgtgtccaa agtggcctgc 35880  
tttggtgaca atggaaaatg catgcttgtc tgctgtttca gtagagggtg agttttaatc 35940  
aaatttcttg gtcattgattt ccctttatga ccattatatt tatttatatg agccaaataa 36000  
gcagttgtca acttgtcata agttacatag cacctatttg caatattcat ggggtggttg 36060  
cttagccctt ttcttcacct gcttttgatt gatgacttcc atctgtgttg cagaattgaa 36120  
ttggagtagt ggactgcact agaagcacct atggccattg tcatactagg aaggttttcc 36180  
cttatcaa atttgattgt tacagagact tctgacacag tgtccagagt tggaggaaat 36240  
tttaaagaga cattaaggga gatgggaggt cttgatagta tttttgacgt tatggtgat 36300  
tttcattcaa cattggaggt gagatctgc taacatcgca tattttacat ttcctttgtt 36360  
caactcta at ggattgtgca ggcttgttcc ttttcgccat ttttagcttta atgtgcttga 36420  
agccacatga aagtaatgct tgtccagata catagccaaa ggttgttata ttttggggca 36480  
tggaaaatgc ttgaggtagt aactattttc atcaggacat ggaaaattgg ctgcaacaca 36540  
aattatgttg ttttatgttg caaaaatagt tttttaatac ttttttattc tgcatgtggt 36600  
gttagtatct tacagttcct ctgatgatta tatccccac gataataaca cttgaaacga 36660  
taataacact tgacatatct acaccaagtg aacattattc atttggtatg tacttttcca 36720  
gctatacttg ctgttcttgc atgtgtaagc aagtttgag taaattgctc attaatataa 36780  
atgcttggtg ttcctatctg tgtacttttt attccccaac taataatgca atcatattac 36840  
gctgataaac tgaataaata aattaacaat atacttctgg tggcaaacct tgtgtatcag 36900  
aatctcataa aggatacatc cacttcagct ttggaccgaa atgaaggaa atctttgcaa 36960  
agtgtgtctc tcctcttgaa atgtttgaaa atattggaaa atgcatatt tctaagcgat 37020  
gataacaagg taatgtcct tatatgttct gtttcagttt agtaccatt tccttcttct 37080  
gtactatctt ctctctgat ttgttctgtg caaaatgtgc aaacagtgcg actttgtatg 37140  
tctgcttaac aattttcttt tcttctgaa aaagcaatat gaactcttac attcattttg 37200  
cttcttgcag acccatttgc ttaatatgag tagaaaattg aaccgaaac gctccttgc 37260

ttcttttgtt ggtgtcatta tcaatactat tgagttatta tcaggtatth ttcttaataa 37320  
tacaatgtgt tcgctaacac aataaaatgt tttaaacatc cagtatgtta aagttgcagt 37380  
ctgacgccta ttttgttttg ctgcagctct ttcaatactt cagaattctt ctgttgtttc 37440  
cagctctaca tatccgaaat cgtctaaagt ctctcaacag agttactctg gtaataacaa 37500  
acaccaatth tgtttgatca gttgatctcg ttggcttttc tatgcactgt ctcaatatag 37560  
tttggtcgcc attcaagtct cactacagat gttgaacttg gcctgacacc aaatatttat 37620  
aaaatgctac ctgatattht taatatthtca tgtttcctga ccagatttat ctgttggtt 37680  
cctcgtataa gtttaattag tgacattctt gaagctttgt tatgcagcag atgtcatggg 37740  
gggaacttca tttaatgatg gaaagagcaa gaactcgaaa aaaaaaact tttgtcgaa 37800  
cagacacgtc attgttgctt atcttcaaaa tcagaagtht ctcatattac tatatcttct 37860  
ggtagtgatg ctggtctgct acagaaggca ttcaattgtt ctccatttat atcaagcaat 37920  
ggggcatcaa gtggttcatt aggcgagagg cacagcaatg gtagtggtt gaagtgaat 37980  
ataaaaaagg atcgtggcaa tgcaaatcca attagaggct caactggatg gatttcaata 38040  
agagcgcaca gttctgatgg gaactccaga gaaatggcaa aaagactccg tctatcttaa 38100  
aatgtaatca ccgacagtgg tgggtggtgat gacccttttg catttgaccg ccgcgtcggc 38160  
gtcgccacca cgtaatcgcc cacgtcgctg ccccgctgc cacgtcgctg accgcgcacg 38220  
gtaatcacac gcctctcgag gccgcgcta gctgatatct tctcatccgg ttgatttgtg 38280  
atthttggcgt ttttgcagtg gtgatggcgg ggggcgaccg tggccgaggc gtggagtgc 38340  
atccgcatca ggggtgatcg gccgcgctgc tccgccctgg tccgcaggct ttggcgcgca 38400  
gctggcggcg gagggagact gtggtgagat cggatttcgc cgtggtggt gtcgctacca 38460  
tgggggattc gccgcaggcg ctctcaggth tgcagcctcc tccactctct tccctthttt 38520  
atthttthtt ctcgcaaaat gtgttgtgat gttcgtctcg ctgggcaggc ctcatagcca 38580  
ttaatgtagt ttgctggaac atthacattt ggaacgttgt tggcaattgc ttgacaaaat 38640  
gtggaattgt ggaggggaga aaaatcattt gaacctgcag tgacaaaatt gccatctcta 38700  
atthttaaac tgaaggtgtg gaaatcaaac ataactattg ccagcgcac atcttgtta 38760  
accacatga tatattgttg gttataacag ttagctccac accaaccttg aaggtgtcaa 38820  
tagaatgtth agtataaatt gaggagaaca ggcagttgtt aagactthct aaagaacttg 38880  
tagcagctaa tactagctat tgtgcatttg tgtthcatgg aatttgagca gcaatggata 38940  
thtcttacta agatgtatga tgcaaaaacaa aaaactatgt ctatacagth tacatgtaat 39000

gtgcggatgc aaataaaatc atgtacatgg acaaactcat gggattcata ccgaattcca 39060  
gaattgcatt tcttatgtgg ttacttttgt tgttgatttg gttaccagac atcgatgtga 39120  
tttcaagggt cagagggggt tgcttctacg cggtggtgc agttgcagca atctttttgt 39180  
ttgtcgccat ggttgtggtt catccacttg tgctcctatt tgaccgatac cggaggagag 39240  
ttcaggaaaa aaatttgaaa ataccattt tttgaaaaag atttacgttt atatacacta 39300  
gtatgaagaa tttgcgaaaa tataactaat ccgcagatcg gttatgcggg agcgcaacaa 39360  
aagtatggcg tggcggcgcg gagtggacgg ccgaggcggt cgcgcggaat ggggctgcgg 39420  
gaccgagcca gtctcgcttg ccggtaacgc ggaaccggt cgctcccgca gcgccagtgt 39480  
gcggaaccgc ggcgccaaca tttttttact gcatggcact gtgtttaata ctgtttgaca 39540  
ctgtttcttg tactgtttta cacagtccc gggtcagttc cgcacaatgg aggcgcggca 39600  
ccgaccatga acaatgtgtg aacagtgtg cacagggtta aaacagtgt taaactgcgc 39660  
tgcacagtgc tggagtcgct ggccactgcg gttccgcgtt ttggaaccgc gggaccgtcg 39720  
cgattccgcg ttttggagct gccggaccat gacggttccg cgcaggatcg tcggteccgt 39780  
attttgaatc tgcggaaccg tcgctgtccc gcgtttccgt ttcgcgggat gcgtatattt 39840  
ttataaaacc tctccatgca tgtatataaa cataaattat tgaaaaaata agtatatttg 39900  
caaatttttt tcgagagctc agcactacat tgcaaagatt tgggcaactc tgacaatttc 39960  
catgttctac aagcttgacg tcgagggaat ggagaacctg ccaccgaata gtagccctgc 40020  
tatctatgtt gcgaaccatc agagtttttt ggatatctat acccttctaa ctctaggaag 40080  
gtgtttcaag ttataagca agacaagtat atttatgttc cgaattattt gatgggcaat 40140  
gtatctctta ggagtaattc ctttgcggcg tatggacagc aggagccagc tggtatggct 40200  
gtagtctcat ccttgccttc ttaagtagac atatatgcaa ttacagaatt tggtaaacaa 40260  
acaagatttt atgaatcata tatgattttg gggaaaacac caaactctct ttgggtggctg 40320  
ccttgaacat agttctattc acacagttat agcaccttct ttaaaatgaa gaactttgtt 40380  
gcatacacat atggccaaac cacataatga attttgttta tttctatctt tgaatgttag 40440  
caccttattt tcatgcatat catgctaatt tgcttgccca cgttgagtgg gaattttttt 40500  
ccatgtttta taatttatat atgttctaga cttctagtcc acaatttatc tacttcatgt 40560  
tcctgagcct ctagtatggc tggtagcaga ctaggtgctg agtgctgtcc atttttgcag 40620  
actgaagaga ggagaaatac aggactgtcc gttgttagtc agatttgtaa aaatagactc 40680  
tgatgtagtt tatttttagcc cctattttat atttaacaat acaaatatat aacgtatcct 40740

aagaacttat cgtaatttag gagaagttgc tcgtttcatt aaattaaact gtgaagtaaa 40800  
aatgtgtgct cgagtctgtc aatgcaatcc tgtgttcttg tttgaagata tgggtgtaggg 40860  
caggctagga tcgaacactg aatggtaaga ctgcttctgc cttcatttgt gcacttggtg 40920  
ctgccacgcc gattaagcag tagaacaag taattttgtc gtgcacaaat gagttatatt 40980  
tcattgaaaa tcgaagtga aatgaaccaa aagatagaag aaaaggggaa acttggtaat 41040  
tatatactcc acaaatttat tggtaagatt tgatattaga cgctcgatta cttggcctaa 41100  
gttaaggata tcaaatttgg ggaagcacca aaggaattat tgtgaaggag ttgtgggtgc 41160  
ataacgttat ctactagggt caaatcctag tgactatgaa tattaatgag taaggtaagg 41220  
gattttattgt taattttagt ttctttaaga ttgtgtccgg gtacaccatt cggtaagtgt 41280  
aataatgttt tgtattggat tcacttgtgt tacgtgcatg tgatttacct tttcatttgt 41340  
ttctgcggtc tgggtatgaa tttgacgaga ttccatggtc agctcaacat atcagttact 41400  
gcgtgtcaag cgatcttata tgggtatgcgc acaagcgatt gtatacggat atgacagtat 41460  
aacgtgtgat attgatacga tgttcccttc ctttataaag gaacaaagac ttttttaaaa 41520  
aaaagaaggg gtattactaa aaaccaaagt gtcaaaaaca aaatatcagt gcacatggca 41580  
agtgtgcacg agcaatagct tgcccttacg ttccattatt agcatgtact actactaact 41640  
acgcaaaaat caattcaccg attattaaac tgttaacatc attttagcac gttaacatat 41700  
gtttcattca acacaccggt tttggcacat ttacaaactt gcaaagttgc aatactccct 41760  
tcgttacata gcataagaga ttttaggtga atgtgacaca tctatccaaa ttcattatac 41820  
tagaatgtat caccgcctcc acgccgggag ggagagcgcc gccggtggag aaagggggag 41880  
ggagtggctg aggggaacca gtaggggtgcc ctccccgtcg ccgcctcccc gtggccgcgc 41940  
cggcgagaca ggaggaagag ggggatatgg agcggcgccg ccggtgaggg cgcgcgcgcg 42000  
ggggggagcg gcgacgccgg tgaggaaggg aaggggagtg gtggctttga gagagatagg 42060  
ggggaggaaa aatgatttta gagttagggt ttgggctgct gagtttttat atagatcggg 42120  
atcaatcagg accgtccatc agatcggaca actacggctt ctcccgcgtt gggccgggtg 42180  
ccactcctag gttgccca caatttgggc acatgtacgc tccgcgtgaa ataagttcac 42240  
tttaggtcct ttaagttgcc tctgaattgt tcccaggccg gccgcactat tgggccaccc 42300  
cataggccat gtgtacgctc cgcacagaat aatttcgctt tagctccctt aatttgtccc 42360  
ctcaaactcc taaaaccagt gcaaactctt aatttttagt tcacccattg caactcacgg 42420  
gcatatttgc tagtgacata taatatgaaa cgaaggatgt agcagactat agaatttaaa 42480

ctgtgctttc attttagagc atcactaact gttatttaga tttttattta aataaatgct 42540  
gaaatgatgt ttttattatg aaaattagca ataaagctcc caaaatttca aaaaaaatt 42600  
aaaagagatt tattaatcat ggttaattta attaaaaatt aaatctaacc atatcatatt 42660  
atttcacggt ccgtgatgag gaaatggcag ctgctatcac ttacgggtggg agagaagggg 42720  
cattgtttat ttttataact atctcttata actcccatga aactataaaa taaatataat 42780  
cattatcata acattagttt tttttccatt gcaacgcaag ggtaattttt cagtacaata 42840  
aaaaaataa aagtgggcca ttctgaacgg aaatttctgg ttttttttcc caagagcgcc 42900  
gcacacaact gcgcaagaga tcgatcgca tcacctgct cgtcgccgat ctccacacc 42960  
atccctgcc tctccttccc ctccactggc tgctgctgca cctgtcagct agggcgggca 43020  
tggcgcgccg cgccgcttcc cgcgctgctg gcgcccttcg ctcgaggggc tcgatccaag 43080  
ggcgaggggg ccgcgcgggg ggcagtggcg gtggcgcgga ggacgcacgc cacgtgttcg 43140  
acgaattgct ccgtcgtggc ataccagatg tcttctccta caatattctt ctcaacgggc 43200  
tgtgtgatga gaacagaagc caagaagctc tcgagttact gcacataatg gctgatgatg 43260  
gaggtgactg cccacctgat gtggtgtcgt acagcacctg catcaatggc ttcttcaagg 43320  
agggggatct ggacaaaatg cttgaccaga ggatttcgcc aaatgttggtg acctacaact 43380  
ctattattgc tgcgctatgc aaggctcaaa ctgtggacaa ggccatggag gtacttacca 43440  
ccatgggtaa gagtggtgtc atgcctgatt gcatgacata taatagtatt gtgcatgggt 43500  
tttgctcttc agggcagccg aaagaggcta ttgtatttct caaaaagatg cgcagtgatg 43560  
gtgtcgaacc agatgttggt acttataact cgctcatgga ttatctttgc aagaacggaa 43620  
gatgcacgga agcaagaaag atttttgatt ctatgaccaa gaggggccta aagcctgata 43680  
ttactaccta tgggtaccctg cttcagggtt atgctaccaa aggagccctt gttgagatgc 43740  
atggtctctt ggatttgatg gtacgaaacg gtatccaccc taatcattat gttttcagca 43800  
ttctagtatg tgcatacgt aaacaagaga aagtagaaga ggcaatgctt gtattcagca 43860  
aaatgaggca gcaaggattg aatccgaatg cagtgcaccta tggaacagtt atagatgtac 43920  
tttgcaagtc aggtagagta gaagatgcta tgctttatth tgagcagatg atcgatgaag 43980  
gactaagacc tgacagcatt gtttataact ccctaattca tagtctctgt atctttgaca 44040  
aatgggagaa ggctgaagag ttatttcttg aaatgttgga tcgaggcatc tgtcttagca 44100  
ctattttctt taattcaata attgacagtc attgcaaaga agggagggtt atagaatctg 44160  
gaaaactctt tgacttgatg gtacgaattg gtgtgaagcc cgatatcatt acccttggca 44220

ggtaagatgg atgaagcaat gaagttactt tctggcatgg tctcagttgg gttgaaacct 44280  
aatactgtta cttatagcac tttgattaat ggctactgca aaattagtag gatggaagac 44340  
gcgtagttc tttttaagga gatggagagc agtgggtgta gtcctgatat tattacgtat 44400  
aacataattc tgcaaggttt atttcaaacc agaagaactg ctgctgcaaa agaactctat 44460  
gtcaggatta cggaaagtgg aatgcagatt gaactttgtt agatttaatt ggataattaa 44520  
tccatttaaa tcaattaaat caaataaatt ccaaggctca ttatgctagg aattcatgtg 44580  
aattcattct tctatgggat atcaatggga tgaagagttt tgagaattaa tccatttgat 44640  
taaggaattg gtaacttata tcaattaatc ctaattgatg gatggttgat gggtgtgtag 44700  
tggaggatgg ttcattggta gttgatgaca attagttgct ctattcctct tectattcca 44760  
ttggtaactt acatcaatta ctcttaattg attgttggtt gatggttgtg tagtggagga 44820  
tggttcatgg ctagttgatg acaattagtt gctccattcc tcttcctatt ccatgactct 44880  
tactcttcat cttccattcc tcttataaaa tgagaatgga tttgatctcc cgcgagaaga 44940  
agaagacaca ctttcatcca ttttcaaaag ctgttgctgc tacggtaatc ccatcccgac 45000  
gagtgtgtgc acacgcgttg ggagagtagg cctccgaaac cacgcgttg cgcgacgttt 45060  
gcacagacgg gcgggagcgc aggttttttg ggagcgcaag gcgcgactac tcaactgttcg 45120  
tcaacatcta cttcatcttc accaacaatgt cgaacactgg agacaaggag aaggagactc 45180  
ccgtcaacac caacggaggc aatactgcct caaactccag cggaggacca ttcttggggt 45240  
ataaccttat tacattattt caattagaag ttttactgtt aatgttcac gcaatgtcaa 45300  
cattgtgtca ttatgtgatt gttgatgctt attcaacgtt aagcatgctc atgttgatta 45360  
cattcaccac tatcactgga tcaaataccta ttgtaaatat catgtttatt atcttgttat 45420  
tttggattaa aatatgccga attatgacca aatttccaac aaacttagca catacaacat 45480  
aatccttcat ggactttgca aaaacaaact cactgatgat gcacttcgaa tgtttcagaa 45540  
cctatgtttg atggatttga agcttgaggc taggactttc aacattatga ttgatgcatt 45600  
gcttaaagtt ggcagaaatg atgaagccaa ggatttggtt gttgctttct cgtctaacgg 45660  
tttagtgccg aattattgga cgtacagatt gatggctgaa aatattatag gacaggggtt 45720  
gctagaagaa ttggatcaac tctttctttc aatggaggac aatggctgta ctgttgactc 45780  
tggcatgcta aatttcattg ttagggaact gttgcagaga ggtgagataa ccagggttg 45840  
cacttacctt tccatgattg atgagaagca cttttccctc gaagcatcca ctgcttcctt 45900  
gtttatagat cttttgtctg ggggaaaata tcaagaatat catatatttc tccctgaaaa 45960



atacaagtcc tttatagaat ctttgagctg ctgaagcatt ttgcagcttt gaaattctgt 46020  
gttggaattc ttttctccta cagtccgatt agaggaggga tcttctctgt atgtgtaaata 46080  
agcgaggtat gtatgtcacc tctccgaatt attttgactg tggttcctgg actgtaaaca 46140  
agctattatc ttctgggtgt gatgccagaa aaaacacaaa agtttgtcgt tatctctact 46200  
aacggatcat aaaggggttt gtaactggag tttaaactt aaggatatcta ggcagtaggt 46260  
atatattgat cctacatctt atgatcttaa gatgatatcc ttctcattat cctctgctga 46320  
aacttttagct tgaaccgtca tctacaccac aatttgagcc ccttagcaca gagcacaacg 46380  
agcaatagct tgcccttacg ttcatatttt agcatgcact actactaact acccaataat 46440  
caatacatcg gttattaaac tgtttgtaca gtttaataat gtcattttat cacgttaaca 46500  
tatgtttcat tcaacaccac accggttttg gcacagttgc aaacttgcaa taacattttt 46560  
actacttctc cgccccataa tataacaate tcgttccata ctatattgct atattacggg 46620  
acggatgaag tacttctttc cttccaaaat ataagaatct agtcctagat tagatattat 46680  
ttggattcac gaatttgatt aggctatcta gattttagt cgtatgtaat gtctaattcg 46740  
gtaatagggtt attacctctt tggatggagg gagtagtttt tatttcgtac tccctctgtt 46800  
tcatattata agttgttttg acttttttct tagtcaaatt ttattgagtt tgactaaatt 46860  
tatagaaaaa aaattagcaa catttaagca ccacattagt ttcatataat gtagcatgga 46920  
atatattttt ataatatgtt tgttttttta ttaaaatgct actatatttt tctataaatg 46980  
tagccaaatt taaagaagtt tgattacgaa aaaaaatcaa aatgacatat aatatgaaac 47040  
tgaggatgta gcagactata gcaaatttaa actatgcttt tatttttagag catcaccaaa 47100  
agagatagcc taaatcttat cttaactaat taaaatattc ataattttcc tttcgtcaca 47160  
ttaaattttc gtccgtaaatt ccgattgaaa tccaactaga caatccaaaa aatagagaaa 47220  
aagaacagaa aaaataataa aaagcacaca aatcttatct caatcccgcg ggaagctgcc 47280  
gatgccgccg aatccgctcg agcgccgccg ccgccgctca cggggaacga tgtcgtgct 47340  
atcgcacgtg gtatgggagg gcgccgccgc cgctgcttgg gagataggat atggagagag 47400  
aaggaaatgt gagggagggt taggtttttc cccattcgta tcttcagcga cacggaggcg 47460  
atccaagctg tccatcagat cagacggctc agaacgcctc catcttcagg ccgcgcatgc 47520  
ttgatgggcc gaggggaaggc cggagggtcg aacaaacgta gtcagaggag gagttggagg 47580  
aggtaaagta gaatttatct gcgggctgag atagtaaag gactgaaaat ggcccataga 47640  
gaaattggga attttattta aataaatgtt gaaaagggtt ttatattatc aaaattagaa 47700

attaagctcc gaaaatttta aaaaatattc aaagagcatt attaatcatg attaatttaa 47760  
taaaaattaa atccaacccat atcatattat ttcacggcgc gcagtaggaa aatgcgcagc 47820  
tgttgtcgct tacgggtggga gagaagggaac attgtttatt ttcagaacta tcttttataa 47880  
ctcccatgga actttaaaat aaatataatc attattatag cattagtttt tttctgtctt 47940  
ttttttcccc aagagcgccg cgcagaagag atcgatcgcg atctccctgc cccgacgtcg 48000  
ccggccgatc tctcattctc tccacgcctt gctcgtcgcc gatctcctac accatccctg 48060  
ccatctcctc ctccccctcc cctctatcct ccaactgggtgc cgcacacctc tccgtataag 48120  
acaaactgcg ttgcggcggtt ggtttccgcc ggcgctgctg ctgcacctgt cagctagggc 48180  
gggcatggcg cgccgcgccg ctccccgcgc tgttggcgcc ctccgctcgg acggctcgat 48240  
ccaagggcga ggaggccgcg cggggggcag tggcgccgag gacgcacgcc acgtgttcga 48300  
cgaattgctc cggcgtggca ggggcgcctc gatctacggc ttgaaccgcg ccctcgccga 48360  
cgtcgcgcgt cacagccccg cggccgccgt gtcccgctac aaccgcatgg cccgagctgg 48420  
cgccgacgag gtaactcccc acttgtgcac ctacggcatt ctcatcggtt gctgctgccg 48480  
cgcgggccgc ttggacctcg gtttcgcggc cttgggcaat gtcattaaga agggatttag 48540  
agtggaagcc atcaccttca ctctctgct caagggcctc tgtgccgaca agaggacgag 48600  
cgacgcaatg gacatagtgc tccgcagaat gaccgagctc gggtgcatac caaatgtctt 48660  
ctctacaaat aatcttctca acgggctgtg tgatgagaac agaagccaag aagctctcga 48720  
gttgctgcac atgatggctg atgatcgagg aggaggtagc ccacctgatg tgggtgtcgt 48780  
taccactgtc atcaatggct tcttcaaaga gggggattca gacaaagctt acagtacata 48840  
ccatgaaatg ctggaccggg ggattttacc tgatgttgtg acctacagct ctattattgc 48900  
tgcgttatgc aagggtcaag ctatggacaa gccatggagg tacttaccac gatggttaag 48960  
aatgggtgtc tgcctgattg catgacatat aatagttatt tcttgaaatg ttggatcgag 49020  
gcatttgtct ggacactatt ttctttaatt caataattga cagtcattgc aaagaaggga 49080  
gggttataga atctgaaaaa ctctttgacc tgatggtagc tattgggtgtg aagcctgata 49140  
tcattacata cagtacactc atcgatggat attgcttggc aggtaagatg gatgaagcaa 49200  
tgaagttact ttctggcatg gtctcagttg gggtgaaacc taatactgtt acttatagca 49260  
ctttgattaa tggtactgtc aaaattagta ggatggaaga cgcgttagtt ctttttaagg 49320  
agatggagag cagtgggtgtt agtcctgata ttattacgta taacataatt ctgcaagggt 49380  
tatttcaaac cagaagaact gctgctgcaa aagaactcta tgtcaggatt accgaaagtg 49440

gaacgcagat tgaacttagc acatacaaca taatccttca tggactttgc aaaaacaaac 49500  
tcactgatga tgcacttcag atgtttcaga acctatgttt gatggatttg aagcttgagg 49560  
ctaggacttt caacattatg attgatgcac tgcttaaagt tggcagaaat gatgaagcca 49620  
aggatttggt tgttgctttc tcgtctaacg gtttagtgcc gaattattgg acgtacaggt 49680  
tgatggctga aatatattata ggacaggggt tgctagaaga attggatcaa ctctttcttt 49740  
caatggagga caatggctgt actgttgact ctggcatgct aaatttcatt gttagggaac 49800  
tgttgacagag aggtgagata accagggctg gcacttacct ttccatgatt gatgagaagc 49860  
acttttccct cgaagcatcc actgcttcct tgtttataga tcttttgtct gggggaaaat 49920  
atcaagaata ttatagggtt ctccctgaaa aatacaagtc ctttatagaa tctttgagct 49980  
gctgaagcat tttgcagctt tgaaattctg tgttgggaatt cttttctcct acagtcctat 50040  
tagaggaggg atcttctctg tatgtgtaaa tagcgaggta tgtatgccac ctctccgaat 50100  
tatttttact gtggttccta gactgtaaac aagcaattat gttatgctgt tgatgccaga 50160  
aaaaacataa aagtttgtcg ttatctctac taacggatca taaagggatt tgtgactgga 50220  
gtttcaaact taatgtgtct aggcagtaat tttgacatta gatccaaaac aatttatagg 50280  
gtttcattaa atttcaccta tgtgtactgt ttaggtgttg aatagtttga cttgtttttt 50340  
aactgaacaa aagatatgtc tgaagctttg ttctttacca aatgcagtac tgatcatcac 50400  
aatataattt ttatggaaca agattggatt gtatagaatg gtttccgac tgattatctt 50460  
atctcaacgt attattatgc acatgtacta atcatgaaat atctgatgga atgatgtttc 50520  
tatttacctg tgtgaggcag caaggagtga gatggataac accacatact ccctctatcc 50580  
cagaatataa gaagtttttag agttggacac gattattaag aaagtaggta gaagtgaagta 50640  
gtggagggtt gtgattgcat gagtagtgga ggtagggtggg aaaagtgaat ggtggagggt 50700  
tgtgattggt tgggaagaga atgttggtag agaagttggt atattttggg gagtacatta 50760  
ttattctaga acaatactgt tgtgctcaag aagcgttcca aagatgtttc acaacctgtg 50820  
ctcgatgggt tttgagctta atcctgggac attcagtatc atgatctgtc tcattcttaa 50880  
acatggaata aaggatgaca gcatgatctt tttgtctcta taatcttttg gctaccacac 50940  
gataatagct gtaaactctat actactttaa aaggagtagt ggtgggtggtg agtgggtgaat 51000  
ctgccaccac cccaccacca actctcaaaa ttctgacatg tgggatact gtcaatccct 51060  
tctccaagac atgtgggatc actgtcaatc ctttctccaa accaattgta tgatagaaca 51120  
gtggaaatca cggacagacc atggagctct caaccataat catccttgcg agttaataac 51180

aaatggagcg taaacttggc aagcaaaaaa ctcaaattaa ttctaaaatt aagctctagg 51240  
attcaaaata gatttcctct ctgcattgtg ctggttatgat ttttaattcc gtaacaacgc 51300  
aaatgcattt tgctagtctt ataaagaagg gttaatgcaa atattctgat taaatgattg 51360  
tatctatgaa gtttgaatgc tagtggaagc tcctttgacc atgttttggt gtgcgagcat 51420  
ttaagagagt gaagagaatg cttctttggt gctgttctgg tatggaagga tccacagata 51480  
aaattcaggt tctactgctt ctctgcttgt aattttcatg aagctgcagt gaataccttg 51540  
ttgaccactt gatctgttgc tttgaaggag aatatagtag tggccaaggt tggtgacggt 51600  
gatggtggca tgtgatcccc cagatcttca gtgaccacaga gaggagggga cggcgcgtgg 51660  
tgagctacaa ggcatactca gtggagggca agatcaaggc ctcccgtccg taggggactc 51720  
cgctgcatca aggccaactg ctccgaactg atcaatttct ggtacggatc acttctcctt 51780  
tccttttttt tttcacctta agcactctct tgattcttcg ctgctacctc ccttaatttc 51840  
tttcaatata ttgtggcact tgatcatggc ggagaccac cttccagtgt gaatggattt 51900  
tgtcaaagaa ctaaatttat tccattagct tattttctga ttacatggaa gacattcttt 51960  
tctggaataa atacagaact aaatcctggt tcctgaataa aagttgtag tgtgtggcat 52020  
ggtgcatttc cgcgcttcta aattttataa aacctgttca ttcaatttga acctgcatcc 52080  
aatccaatat tttaggtgca gacagggtgt tgcggtcagg ttaaagaagt tggcaaaaat 52140  
gcttctgaag aaagggtaat tgttggttca tctcaggagg taatatgcag atgattattc 52200  
caattggcat tgccttgcca tttttatcac gagtctttac aattttatat cctcctacat 52260  
attctttcca gattccagat gatccagtgt ctccaacaat tgaggcgctt attttgctcc 52320  
atagtaaagc aagtacactt gctgagaacc accagttgac aacacggctt gttgtacat 52380  
caaacaaagt tggttgtatt cttggggaag gtggaaaggt aattactgaa atgagaagac 52440  
ggactggggc tgaaatccga gtctactcaa aagcagataa acctaagtac ctgtcttttg 52500  
atgaggagct tgtgcaggta atttatttgg ccatacctac accagagatc catatattac 52560  
ttttataact gcagttttta cttgttaaca tttcattgtg cttttacatt tgttccaagc 52620  
tttcaggttg ctgggcttcc agctattgaa agaggagccc tgacagagat tgcttcgagg 52680  
ctttgaacta ggacactcag agatggaagt tcttccaata atccgacacc ttttgcccct 52740  
gttgatggtc ctctgttga tatcttgctt aacaaggaat tcatgctata tggacgatct 52800  
gctaatagtc ccccatatgg agggcctgct aatgatccac catatggaag acctgccatt 52860  
gatccacat atggaagacc aatatccaca atatggaaga cctgccaatg atccaccata 52920

tagaagacct gtcaatgata catcatattg agggttggac aatgatgggc ctctgatca 52980  
 ggccccgtcc tgaggggggt cgaatggggc gatcgctccg ggcccccgat tcccagggcc 53040  
 cccacctatc tgtgcaacga gtagtagcga tcttcacg cgcaacgtga ggcgatgttt 53100  
 ctccgtgatt tcgccggcct gcaactgcga gatcgcgagt ataacgatca gccgatcgat 53160  
 ctcatctgcc gactgccatg ctgatgccac acgcaagcgc agcatatcag ccttatcttg 53220  
 gttgatcggc atgctggacg agcacatctg ttgtcgcac aactgctgac tgctatatat 53280  
 gtgctgggtc tgaatcgatc gattgtcgtc gcggaagtga agaacaacca cggcactgct 53340  
 gcctgctggg ctctagccgc catcagtaag tacgctatac tgcctatcta gatctagatc 53400  
 gagattacat agtggaaatta tctgtttata acaaaattac aaggatcaa ttgataattt 53460  
 aaggttataa ccgtacaaac ttcagtgatt tgctgggttc acattgggta gatttggttc 53520  
 aactaatttg gtacttctgt agccttgtaa tttacgaatc tagtattaat attttcttaa 53580  
 gtattagcct gttccttgat attatgctgt tgagaaagta tgcaatagat aacaaaaaca 53640  
 agtaggtgtg ttgaggatgc tcaagagtaa tacagccact tcaataattc tgatattatc 53700  
 aggacatcat caataattct gcgcctacaa atcttcaaag aaaattttaa tataatgcgt 53760  
 atgatttttt aaatacgaat attgattgct atttaaagat atttatatta tatggtaatt 53820  
 attatttgaa ggttttataat aaaggcctcc gtttttagtt tcacgctggg ccttcagaat 53880  
 ctcaggaccg gccctgctca tgate 53905

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 29

atcaggagcc ttcaaattgg gaac 24

<210> 30

<211> 24

<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer for amplification  
<400> 30  
ctcgcaaatt gcttaatttt gacc 24

<210> 31  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer for amplification  
<400> 31  
tgaaggagtt atgggtgcgt gacg 24

<210> 32  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer for amplification  
<400> 32  
ttgccgagca cacttgccat gtgc 24

<210> 33  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 33

gcgacgcaat ggacatagtg ctcc 24

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 34

ttacctgcca agcaatatcc atcg 24

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 35

aaggcatact cagtggaggg caag 24

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 36

ttaacctgac cgcaagcacc tgtc 24

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 37

tggatggact atgtggggtc agtc 24

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 38

agtggaagtg gagagagtag ggag 24

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 39

ccctccaaca cataaatggt tgag 24



<210> 40  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer for amplification  
<400> 40  
tttctgccag gaaactgtta gatg 24

<210> 41  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer for amplification  
<400> 41  
gcgatcttat acgcatacta tgcg 24

<210> 42  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer for amplification  
<400> 42  
aaagtctttg ttccttcacc aagg 24

<210> 43

<211> 26  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer for amplification  
<400> 43  
gaggatttat caaaacagga tggacg 26

<210> 44  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer for amplification  
<400> 44  
tgggcggcag cagtggagga taga 24

<210> 45  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer for amplification  
<400> 45  
aagaaggag ggttatagaa tctg 24

<210> 46  
<211> 24  
<212> DNA

<213> artificial sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer for amplification  
<400> 46  
atatcaggac taacaccact gctc 24

<210> 47  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer for amplification  
<400> 47  
acgagtagta gcgatcttcc agcg 24

<210> 48  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer for amplification  
<400> 48  
cagcgtgaaa ctaaaaacgg aggc 24

<210> 49  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 49

atccacatc atcataatcc gacc 24

<210> 50

<211> 25

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 50

agcttctccc ttggatacgg tggcg 25

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 51

atttggtggt tagttgcggc tgag 24

<210> 52

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 52

gcccaaactc aaaaggagag aacc 24

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 53

cctcaagtct cccctaaagc cact 24

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 54

gctctactgc tgataaaccg tgag 24

<210> 55

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 55

tggatggact atgtggggtc agtc 24

<210> 56  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer for amplification  
<400> 56  
agtggaagtg gagagagtag ggag 24

<210> 57  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer for amplification  
<400> 57  
tacgacgcca tttcactcca ttgc 24

<210> 58  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer for amplification  
<400> 58  
catttctcta tgggcgttgc tctg 24

<210> 59  
<211> 26

<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer for amplification  
<400> 59  
acctgtaggt atggcacctt caacac 26

<210> 60  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer for amplification  
<400> 60  
ccaaggaacg aagttcaaat gtatgg 26

<210> 61  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer for amplification  
<400> 61  
tgatgtgttt gggcatccct ttcg 24

<210> 62  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 62

gagatagggg acgacagaca cgac 24

<210> 63

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 63

tcctatggct gtttagaaac tgcaca 26

<210> 64

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 64

caagttcaaa cataactggc gttg 24

<210> 65

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification



<400> 65

cactgtcctg taagtgtgct gtgc 24

<210> 66

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 66

caagcgtgtg ataaaatgtg acgc 24

<210> 67

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 67

tgcctactgc cattactatg tgac 24

<210> 68

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for amplification

<400> 68

acatactacc gtaaattggc tctg 24

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP02/09429

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/29, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/29, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Yoshimichi FUKUDA et al., "RFLP Marker o Mochiita Ine no Nensei Kaifuku Idenshi(Rf-1) ni Kansuru Rensa Bunseki", Breeding Science, 1992, Vol.42, suppl.1, pages 164 to 165	1-18
A	JP 9-313187 A (Mitsui Toatsu Chemicals, Inc.), 09 December, 1997 (09.12.97), (Family: none)	1-18
A	JP 2000-139465 A (Mitsui Chemicals, Ltd.), 23 May, 2000 (23.05.00), (Family: none)	1-18
P, A	JP 2002-345485 A (Japan Tobacco Inc.), 03 December, 2002 (03.12.02), (Family: none)	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search  
21 November, 2002 (21.11.02)

Date of mailing of the international search report  
10 December, 2002 (10.12.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/29, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/29, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	福田 善通 等, RFLPマーカーを用いたイネの稔性回復遺伝子(Rf-1)に関する連鎖分析, 育種学雑誌, 1992, Vol. 42, suppl. 1, p. 164-165	1-18
A	JP 9-313187 A (三井東圧化学株式会社) 1997. 12. 09 (ファミリーなし)	1-18
A	JP 2000-139465 A (三井化学株式会社) 2000. 05. 23 (ファミリーなし)	1-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 11. 02

国際調査報告の発送日

10.12.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4B

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

